FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1916 — THÈSE — N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

PRÉSENTÉE PAR

Louis BARAT

Médecin aide-major de 2e classe,
Ancien interne des Hôpitaux de Paris,
Agrégé de l'Université.

LES BACTÉRIES SUSPECTES DES BIÈRES FLAMANDES

Président : M. Pierre MARIE, professeur.

Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

PARIS
IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL
L. MARETHEUX, Directeur
1, RUE CASSETTE, 1
1916

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Le Doyen	M. LANDOUZY.
Assesseur	M. G. POUCHET.
Professeurs	MM.
Anatomie	NICOLAS.
Physiologie	Ch. RICHET.
Physique médicale	WEISS.
Chimie organique et chimie générale	DESGREZ.
Parasitologie. Histoire naturelle médicale.	R. BLANCHARD.
Pathologie et thérapeutique générales.	ACHARD.
Pathologie médicale	WIDAL. TEISSIER.
Pathologie chirurgicale	LEJARS.
Anatomie pathologique	Pierre MARIE.
Histologie	PRENANT.
Opérations et appareils	Auguste BROCA.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET.
Thérapeutique	N...
Hygiène	CHANTEMESSE.
Médecine légale.	N...
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LETULLE.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER.
Clinique médicale	DEBOVE. LANDOUZY. GILBERT. CHAUFFARD.
Maladies des enfants	HUTINEL.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale.	N...
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	GAUCHER.
Clinique des maladies du système nerveux	DEJERINE.
Clinique chirurgicale	Pierre DELBET. QUÉNU. N... HARTMANN.
Clinique ophtalmologique.	DE LAPERSONNE.
Clinique des maladies des voies urinaires.	LEGUEU.
Clinique d'accouchements.	BAR. COUVELAIRE. RIBEMONT-DESSAIGNES.
Clinique gynécologique	POZZI.
Clinique chirurgicale infantile	KIRMISSON.
Clinique thérapeutique	Albert ROBIN.
Hygiène et clinique de la 1re enfance	MARFAN.

Agrégés en exercice :

MM. ALGLAVE	MM. GUILLAIN	MM. LÉRI	MM. ROUSSY
BERNARD	JEANNIN	LOEPER	ROUVIÈRE
BRANCA	JOUSSET (A.)	MAILLARD	SAUVAGE
BRUMPT	LABBÉ (Henri)	MOCQUOT	SCHWARTZ (A.)
CAMUS	LAIGNEL-LAVASTINE	MULON	SICARD
CASTAIGNE	LANGLOIS	NICLOUX	TANON
CHAMPY	LECÈNE	NOBÉCOURT	TERRIEN
CHEVASSU	LEMIERRE	OKINCZYC	TIFFENEAU
DESMAREST	LENORMANT	OMBREDANNE	VILLARET
GOUGEROT	LEQUEUX	RATHERY	ZIMMERN
GRÉGOIRE	LEREBOULLET	RETTERER	
GUÉNIOT		RICHAUD	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MA MÈRE

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE MARIE

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

A Monsieur le Professeur DUPRÉ, mon maître depuis plusieurs années.

Stage 1907-1908. — Messieurs les Professeurs agrégés RENON et CAMPENON

EXTERNAT

1908-1909. — Monsieur le Professeur RECLUS (*in mem.*), Monsieur le Docteur MOUTARD-MARTIN

1909-1910. — Monsieur le Docteur MOSNY

1910-1911. — Monsieur le Docteur DENY

INTERNAT PROVISOIRE

1911-1912. — Messieurs les Docteurs LAFFITTE, GOUGET, ROBINEAU

INTERNAT

1912-1913. — Monsieur le Docteur SÉGLAS

1913-1914. — Monsieur le Professeur THOINOT (*in mem.*)

1914. — Monsieur le Docteur MOSNY

MM. les Drs CHASLIN, RAMOND, CLAISSE (*in mem.*), MAILLARD, VURPAS, CAMUS

qui, seules, m'ont permis de caractériser avec certitude des espèces microbiennes mal connues ou nouvelles.

J'adresse enfin des remerciements sincères à MM. A. Duflot et Noël, président et vice-président du syndicat des brasseurs de la région de Dunkerque. L'un et l'autre m'ont grandement facilité la connaissance des particularités régionales de la technique brassicole. Je dois, en particulier, à M. Noël d'avoir pu assister, dans son établissement, à des essais de procédés nouveaux, qui ont été pour moi autant d'expériences, d'autant plus précieuses, qu'elles étaient réalisées, non dans les conditions toujours artificielles des recherches de laboratoire, mais dans celles mêmes de la pratique industrielle.

INTRODUCTION

OBJET, LIMITES, ET PLAN DE NOTRE ÉTUDE SUR LES BIÈRES FLAMANDES

Le présent travail a eu pour origine une vaste enquête entreprise, dans la région des Flandres, par le laboratoire de bactériologie et chimie d'armée, dirigé d'abord par M. le médecin principal Roussel, puis par M. le médecin aide-major de 1re classe M. Brûlé, aux fins de contrôler la pureté bactérienne des bières débitées aux troupes du secteur. Nous avons tenu à lui conserver, malgré le développement inévitable de certains chapitres de bactériologie pure, l'orientation proprement médicale de l'œuvre commune déjà résumée dans des publications antérieures (1). Non seulement nous utiliserons les documents qui ont servi de base à ces publications, et ceux même que le laboratoire a réunis depuis lors ; mais l'importante question d'hygiène publique qui suscita toutes ces recherches sera celle-là même que, par des méthodes plus variées, nous nous proposons de traiter dans les pages suivantes de cette étude.

Celle-ci ne saurait donc, à aucun titre, passer pour un ouvrage technique concernant la fabrication de la bière en général. Tout d'abord, elle se limite strictement à un type de bières très spé-

(1) L. Roussel, M. Brulé, L. Barat et A.-P. Marie. Communication à l'Académie de Médecine (19 octobre 1915 et 18 janvier 1916). — Recherches bactériologiques sur les bières des Flandres (*Revue d'Hygiène et de Police sanitaire*. Tome XXXVIII, n° 1, janvier 1916, p. 59).

ciales, obtenues par des procédés très différents de ceux usités en beaucoup d'autres régions, et d'une composition chimique assez particulière. Ensuite et surtout, les souillures bactériennes sur lesquelles nous tenons à appeler l'attention ne sont nullement de celles qui altèrent les qualités marchandes de la bière, c'est-à-dire, par exemple, sa fluidité, sa transparence, sa saveur, sa bonne conservation. Nous n'envisagerons à aucun moment les infections microbiennes réunies sous le nom de « maladies de la bière », comme la tourne, le filage, etc. Bien que celles-ci aient une importance industrielle considérable, et que, par suite, elles aient fait à maintes reprises l'objet d'études systématiques, elles n'ont, au point de vue de l'hygiène publique, qu'un intérêt très secondaire : des infections qui modifient de façon si apparente le liquide livré au consommateur mettent immédiatement celui-ci en garde contre une boisson plus désagréable encore que nocive.

Les souillures bactériennes que nous allons étudier sont latentes. Elles consistent dans la présence, en quantités parfois énormes, de germes suspects, ou tout au moins généralement classés comme tels dans la pratique journalière des analyses d'eaux de boisson. Peut-être expliquent-elles certains accidents intestinaux dont nous aurons à fournir une brève description. Elles sont telles, en tous cas, qu'une eau contenant pareille quantité de semblables germes est toujours regardée comme impropre à la consommation. Ces germes sont avant tout suspects comme associés habituels ou proches parents de bactéries pathogènes; spécialement, de bactéries agents d'infections intestinales. Leur présence n'altère en rien l'apparence ou les qualités apparentes de la bière. Elle ne s'oppose pas à sa bonne conservation. Lorsqu'une bière abandonnée à elle-même se trouble, se recouvre d'un voile épais, dégage une odeur aigre ou fade, devient filante et visqueuse, ce ne sont pas ces bactéries qu'il faut incriminer; mais, suivant les cas, des ferments des matières azotées, comme les bactéries du groupe *mesentericus*, des sarcines, des ferments acétiques, des levures sauvages, des moisissures.

*
* *

Nous ne voulons certes pas dire que le groupe de germes spécialement visé dans cette étude soit sans importance au point de vue de la fabrication de la bière. Comme nous le verrons, les microbes qui le composent sont introduits non pas dans la bière achevée, mais au début même de la fermentation, en même temps que la levure et parfois avant elle. Ils participent donc d'une façon certaine, quoique dans des proportions sans doute très minimes, à la transformation du moût. Si l'on voulait se poser dans toute son ampleur le problème biochimique de la fermentation des bières, il faudrait sans doute tenir compte, non pas de la seule activité des levures, mais aussi du travail obscur d'une foule de micro-organismes collaborant avec elles par des actions chimiques très diverses, et continuant, même après leur disparition, la lente décomposition du milieu. Mais nous n'avons ni les moyens matériels, ni la compétence nécessaire pour aborder cette délicate étude, et, au surplus, les termes mêmes de la question qui nous occupe auraient, à eux seuls, suffi à nous en détourner, et à limiter le champ de nos recherches.

Sans doute, nous ne pouvons pas esquiver le problème de la concurrence vitale des espèces microbiennes, dans une étude destinée précisément à montrer comment des germes suspects ou pathogènes peuvent être ensemencés dans la bière, y vivre, y pulluler, ou y être détruits. Mais il se trouve qu'en fait, les germes en question, appartenant presque tous, soit au genre colibacille, soit à des genres voisins, sont précisément, dans le travail de la transformation du moût, des ouvriers de la première heure, introduits au moins aussi précocement que les levures; aussi rapides ou plus rapides qu'elles à se mettre en besogne; plus prompts aussi, en général, à s'interrompre ou même à disparaître. Nous montrerons en particulier que, même lorsqu'ils survivent à la clarification de la bière, leur multiplication semble définitivement arrêtée. Il n'est donc nullement arbitraire de considérer cette opération du collage des bières, qui conclut

définitivement la phase d'activité des levures (1), comme une limite au delà de laquelle il devient pour nous inutile de suivre les modifications complexes qu'imposent au milieu de nouvelles équipes d'agents destructeurs. C'est pourquoi nous n'étendrons pas nos recherches sur l'évolution de la flore des bières au delà de cette courte période

*
* *

Les mêmes considérations nous conduiront à réduire considérablement, dans notre étude, la place accordée à la description de certaines espèces, même fréquemment rencontrées. En effet, parmi les innombrables bactéries qui peuvent être présentes dans le moût en fermentation ou dans la bière clarifiée, celles-là seules nous intéressent, qui pullulent dans le milieu concurremment avec les germes suspects, et peuvent, comme eux, rester vivants dans la boisson clarifiée. Nous pouvons donc négliger, non seulement les bactéries mal adaptées au milieu chimique qu'elles rencontrent dans les cuves des brasseurs, et éliminées dès les premières heures qui suivent l'ensemencement ; mais celles qui, restant durant une longue période presque complètement inactives, ne révèlent leur présence que très tardivement, par leur action destructive sur les divers éléments de la bière : alcool, dextrines, matières azotées, etc... Nous laisserons donc absolument à part les ferments acétiques, les mycodermes, les moisissures, dont la phase d'activité coïncide avec une période où la bière n'est plus propre à la consommation.

Même avec ces restrictions, la tâche serait encore immense si nous devions établir exactement le bilan de ce que, dans ce court délai de la fermentation en brasserie, chaque espèce microbienne, présente et réellement active, détruit et produit dans le moût. Une telle étude serait intéressante au plus haut point, non

(1) Il convient de ne pas donner à cette expression un sens trop absolu : 1° parce que quelques cellules de levure subsistent toujours dans la bière et restent vraisemblablement actives ; 2° parce que des germes très variés, plus ou moins analogues aux précédents et désignés sous le nom global de « levures sauvages », continuent également à végéter dans le liquide clarifié.

seulement au point de vue biologique, mais au point de vue industriel, parce que l'arome, le « bouquet » de la bière doivent probablement dépendre en partie de ces fermentations accessoires microbiennes. Mais nous avons ici uniquement en vue de déterminer les facteurs qui favorisent ou entravent le développement de germes suspects dans le moût en fermentation ; et nous ne nous intéresserons à l'activité biochimique des bactéries présentes dans la bière, que dans la mesure où elle nous paraîtra pouvoir jouer un rôle sérieux dans ces actions adjuvantes ou inhibitrices.

Si l'étendue de nos recherches proprement bactériologiques se trouve ainsi nettement circonscrite en vue d'une application pratique à l'hygiène publique, des considérations de même ordre nous forceront, au contraire, à développer les résultats d'une enquête qui nous a permis de suivre dans une vaste région les conditions industrielles de la production de la bière. La souillure colibacillaire des bières, systématiquement recherchée et trop souvent constatée par notre laboratoire, devait nous conduire à préciser les circonstances habituelles de l'infection. Celles-ci, une fois trouvées, nous ont paru si communes et si graves, que nous avons dû nous demander comment la souillure n'était ni fatale, ni même générale, et comment certaines brasseries y échappaient régulièrement. C'est ainsi qu'à l'étude de l'ensemencement, de la pullulation et de la survie des germes suspects, est venue se superposer celle des circonstances qui restreignent ou annulent cet ensemencement, refrènent cette multiplication et abrègent cette survie. Ici encore, nos hypothèses ont reçu la sanction pratique de statistiques étendues, permettant de suivre les étapes de la lutte des brasseries contre l'infection ; et nous aurons la satisfaction de pouvoir exposer, avec les mesures qui nous ont paru dictées par l'expérience, les résultats obtenus par les industriels qui ont bien voulu les appliquer.

* * *

Soit dans les enquêtes du laboratoire, soit dans nos recherches personnelles, nous nous sommes laissé guider par les faits. Ceux-ci nous ont d'abord imposé la constatation d'accidents gastro-intestinaux qui ne semblaient pouvoir être imputés qu'à l'absorption de bière ; — puis, celle de la présence, dans cette boisson, de bactéries que des spécialistes affirmaient ne pouvoir y subsister ; — puis enfin, celle de l'extrême fréquence de cette souillure. C'est quand le nombre des faits observés est devenu imposant ; quand le problème de l'impureté bactérienne des bières s'est posé comme devant intéresser l'hygiène alimentaire de toute une région et de toute une armée, qu'il nous a paru nécessaire de le résoudre, si possible, avec précision, et qu'ont été entreprises des recherches de laboratoire. Celles-ci n'ont donc pas été inspirées, dans leur principe, par une simple curiosité scientifique, mais par le sentiment qu'il était urgent de les entreprendre, et nécessaire de les mener à bonne fin. C'est pourquoi nous n'avons pas à chercher le plan qui permettra au lecteur d'en saisir tous les détails. Il nous suffira de retracer pour lui les étapes mêmes de notre œuvre : tout d'abord, la nature et les conditions de production des bières suspectes ; puis, les motifs, la méthode et les résultats généraux de l'enquête régionale établissant la réalité et la fréquence d'une souillure bactérienne particulière ; ensuite, la détermination exacte du moment et des circonstances de la contamination de la bière ; puis, l'étude des procédés par lesquels, dans les cas favorables, sont éliminés les germes suspects ; enfin, les conclusions pratiques qui nous ont paru être l'aboutissant naturel de nos recherches, et les premiers résultats industriels de leur application.

Afin de ne pas entraver la progression logique de cet exposé, nous avons dû rejeter, dans une sorte d'appendice, un chapitre de bactériologie pure, où le lecteur trouvera la description d'un certain nombre d'espèces microbiennes, auxquelles il est fait

allusion dans ce travail. Les unes sont bien connues, et il ne leur a été consacré qu'une note sommaire, le plus souvent accompagnée de quelques remarques basées sur nos observations personnelles. Lorsqu'il s'agissait au contraire, soit d'espèces banales, mais dont les descriptions classiques sont encore rudimentaires, soit de variétés nouvelles d'espèces connues, soit d'espèces entièrement nouvelles, nos descriptions ont été aussi complètes qu'il était en notre pouvoir de les faire.

LES BACTÉRIES SUSPECTES
DES BIÈRES FLAMANDES

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

LA BRASSERIE FLAMANDE

§ 1. — *Procédés de fabrication.*

Nos recherches ne portent que sur des bières fabriquées dans la région des Flandres, et même sur une catégorie déterminée de bières, définies à la fois par leur mode de fabrication et par leurs propriétés chimiques. La zone où on les produit surtout comprend nos départements du Nord et la partie adjacente de la Belgique. Dans nos départements de l'Est, en effet, comme dans nos villes du centre et comme en Allemagne et en Angleterre, le type dominant est la bière obtenue par fermentation basse, en cuves, alors que celle que nous étudions est issue de fermentation haute, en tonneaux. Quelques éclaircissements sur la fabrication de la bière en général, nous semblent indispensables pour faire bien comprendre les procédés caractéristiques de l'industrie dont nous avons à étudier les produits.

Quel que soit le mode de fermentation usité, il est un certain nombre d'opérations qui n'ont rien de spécial à une fabrication déterminée. Ce sont celles qui aboutissent à la production du

moût, liquide sucré destiné à subir la fermentation alcoolique sous l'action de la levure.

Le maltage et le malt. — Le sucre contenu dans le moût provient de la saccharification de l'amidon du grain d'orge. Cette hydrolyse de l'amidon est effectuée par les diastases que la germination développe à l'intérieur du grain. La matière première essentielle à la fabrication de la bière est donc l'orge germée ou malt. Les opérations de maltage sont celles qui ont pour but de faire germer l'orge ; puis de le dessécher quand la germination a atteint le degré voulu. Le malt contient, outre des parties cellulosiques inutilisables dans la fermentation, des matières azotées et des sels minéraux en partie seulement employés à la nutrition de la levure, et surtout, une forte proportion de maltose, quelques restes d'amidon non transformé et une notable quantité d'amylodextrines intermédiaires entre l'amidon et le sucre. Une grande partie de ces amylodextrines et de cet amidon résiduel se transformeront à leur tour en sucre, spécialement en maltose, lors du brassage.

Le brassage. — Cette dernière opération consiste à faire infuser une proportion définie de malt séché et concassé, dans un certain volume d'eau, à une température favorable à l'action des diastases. Le brassage est effectué dans un récipient spécial, ou cuve matière, pourvu d'un agitateur rotatif et d'un faux fond perforé, situé à quelques centimètres au-dessus du vrai fond. Il débute par un travail préparatoire durant lequel la farine humectée d'eau à la température moyenne de 50 à 60 degrés suivant les cas (45 à 55 degrés en hiver, 58 à 62 degrés en été), est convertie en une masse bien homogène par l'agitation. L'eau destinée à l'infusion est ensuite introduite de bas en haut, par le faux fond perforé de la cuve matière ; non pas en une seule fois, mais en deux ou trois reprises au moins, séparées par des intervalles durant lesquels la masse est laissée en repos. A chaque nouvelle admission, l'eau est à une température plus élevée que lors de la précédente, et on cherche même à obtenir, durant chacune de ces admissions, une élévation croissante de la température. Ainsi le mélange finit, au bout d'une heure un quart à une heure et demie, par être porté en entier à une température

de 68 à 70 degrés. Après un repos d'une durée presque égale, durant lequel les diastases opèrent la saccharification de l'amidon et des amylodextrines, le moût est soutiré, c'est-à-dire qu'on le fait écouler par les trous du faux fond, sur lequel sont retenues les parties solides ou drêches. Habituellement, on fait une deuxième infusion ou deuxième trempe, en introduisant à nouveau, par le même procédé, une nouvelle quantité d'eau à une température croissante, en général plus élevée qu'à la première reprise. La totalité du moût est alors répartie dans des chaudières. De multiples modifications peuvent être apportées à cette méthode : trempes supplémentaires, addition de nouvelle farine de malt pour la deuxième trempe; usage de filtres-presses spéciaux pour retenir les drêches; mélange du malt avec des proportions variables de malt de froment, ou de riz et de maïs non germés, etc. Retenons simplement que le produit du brassage est le moût : liquide brun foncé, limpide et brillant. Il est constitué essentiellement : 1° d'albumines incomplètement transformées par la pepsine du malt; de corps voisins des peptones et d'acides aminés cristallisables; 2° de sucre, surtout du maltose, accessoirement du saccharose, du glucose et du lévulose; et des maltodextrines, plus ou moins proches encore de l'amidon initial et, par suite, plus ou moins rebelles à la fermentation; 3° de sels minéraux : avant tout, de phosphates acides.

Dans un autre procédé dit : brassage par décoction, une partie du moût est retirée de la cuve-matière avant la fin de la saccharification, portée à l'ébullition en chaudière, et reprise au moins partiellement en cuve-matière. Après un certain temps de repos, une nouvelle quantité de moût passe en chaudière et subit le même sort. On renouvelle en général cette manœuvre une troisième fois, puis tout ce qui reste dans la chaudière est versé à nouveau en cuve-matière, où le travail de saccharification s'achève. Cette méthode a, comme on le voit, l'avantage de cuire l'amidon et de le rendre par là plus aisé à hydrolyser; mais, en même temps, chaque partie du moût porté en chaudière perd ses diastases. De là, la nécessité de fragmenter l'opération, afin de laisser toujours en cuve-matière une proportion suffisante de diastases actives. A la fin de la saccharification, le moût est soutiré comme précédemment.

Le houblonnage. — Il est ensuite, dans tous les cas, cuit et houblonné. On le verse pour cela dans des chaudières où il est rapidement porté à l'ébullition. Le houblon n'est en général ajouté qu'après un certain temps, quand le moût a cessé de former de l'écume. La chaleur détruit les diastases et les ferments organisés existant dans le liquide. Son action, unie à celle du tanin contenu dans le houblon, coagule et précipite une bonne part des albumines jusque-là tenues en dissolution : précipitation d'autant plus aisée qu'elle se fait en milieu acide et assez riche en sels. Enfin, la cuisson et le houblonnage ont encore pour but de communiquer au moût l'arome spécial du houblon, et de ramener la liqueur à une densité déterminée.

Quelques brasseurs n'introduisent pas le houblon à ce moment, mais plus tard ; par exemple, lors de la réfrigération ; — dans ce cas ils ajoutent le plus souvent en chaudière un peu de tanin destiné à coaguler les albumines et à clarifier le moût.

Réfrigération. — Le liquide, au sortir des chaudières, passe sur des appareils destinés à le ramener à une température telle que la levure puisse être ensemencée et commencer son travail. Ces appareils sont, soit des bacs : vastes cuves plates, où le moût repose en couche mince ; soit des réfrigérants : surfaces plissées ou tubulaires refroidies par un courant intérieur d'eau fraîche, et sur lesquelles il descend, pour être recueilli dans une gouttière inférieure. Nous aurons d'ailleurs à revenir assez longuement sur la description de ces appareils.

Ensemencement de la levure. — Le moût refroidi est versé dans une cuve spéciale ou cuve guilloire, où il est mélangé à la levure, et où il peut subir certaines manipulations destinées à l'enrichir en oxygène. Le mélange fait, la fermentation commence. Celle-ci peut se faire en cuves ; et c'est ainsi qu'opèrent quelques grandes brasseries de notre région. Mais, dans la très grande majorité de celles visées par nos statistiques, le moût ensemencé dans la cuve guilloire est ensuite réparti en fûts.

Fermentation. — Ceux-ci, installés dans des caves dont la température moyenne est, ou devrait être, de 15 à 18 degrés, sont disposés horizontalement, en sorte que leur bonde ouverte ne

soit pas exactement dirigée en haut, mais un peu inclinée sur le côté. La levure qui s'en échappe glissera ainsi le long des flancs du tonneau pour être recueillie au bas de celui-ci dans un baquet.

Sous l'action de la levure, une grande partie du sucre sera transformée en alcool et acide carbonique. Les fûts étant exactement remplis, le début de la fermentation se manifeste au bout de trois ou quatre heures par l'apparition d'une écume blanche ; après six ou huit heures, l'acide carbonique se dégage en grande quantité et une mousse abondante s'échappe (fermentation tumultueuse). Au bout de vingt-quatre heures, le rejet de la levure est presque complètement arrêté. On remplit alors les fûts avec de la bière expulsée par les bondes et recueillie dans les baquets, et la mousse reparaît en quantité modérée. Bientôt, une masse visqueuse et jaunâtre apparaît à la bonde et s'écoule sur les flancs du tonneau : c'est l'expulsion de la levure qui commence. Pour assurer la régularité de ce rejet, on pratique le remplissage régulier des fûts à l'aide du liquide prélevé dans l'un d'eux, entamé à cet effet.

Cette expulsion se poursuit jusqu'à la fin de la fermentation dite principale ; si elle a été normale, elle doit être presque totale, sans dépôt, et la bière doit rester claire.

Clarification. — Cependant, afin d'éliminer les cellules de levures en excès et les débris végétaux restés en suspension, les brasseurs pratiquent généralement, avant livraison, une opération de clarification dite : collage. Une masse gélatineuse en dissolution dans l'eau chaude est mélangée à la bière où, en partie grâce au refroidissement subi, en partie sous l'action du tanin, elle se coagule sous forme d'un réseau très serré qui se rétracte, entraînant toutes les particules solides en suspension. Si on emploie, par exemple, comme c'est l'usage le plus général dans les Flandres, la peau de raie dissoute dans l'acide tartrique ou sulfureux, la masse montera à la surface du liquide et sera expulsée par la bonde. Si on utilise, au contraire, la colle de Chine, elle se précipitera au fond du tonneau. La bière clarifiée est considérée comme immédiatement livrable au consommateur. Cette clarification se fait, en général, pour les bières envisagées dans notre étude, à la fin du quatrième jour de la fermen-

tation. Par opposition à cette fermentation principale, les fermentations qui se produisent après clarification, sous l'action des cellules de levure subsistantes, prennent le nom de fermentations secondaires. Elles sont normalement très discrètes et ont pour résultat de maintenir la richesse de la bière en acide carbonique.

Le procédé de fabrication que nous venons de décrire : brasserie par fermentation haute en fûts, est celui qui est presque universellement pratiqué dans la région à laquelle s'étendent nos statistiques. Il est, en tout cas, le seul que nous aurons en vue dans cette étude.

§ 2. — *Caractéristiques chimiques des produits.*

Je dois à l'obligeance de MM. les pharmaciens aides-majors Javillier et Hazard les tableaux suivants : le premier donne l'analyse assez détaillée de dix bières de la région ; la dixième, qui s'éloigne notablement des neuf autres, est un stout de la Flandre belge.

Le deuxième tableau donne les chiffres maximum, minimum et moyen des principaux éléments des bières flamandes ; ces chiffres ont été établis d'après de très nombreuses analyses faites au laboratoire d'armée.

Il existe, sans doute, des différences chimiques notables entre les différentes bières analysées ci-dessus ; mais elles ne semblent pas en rapport direct avec la présence ou l'absence du coli. En particulier, les éléments qui, par leur action bactéricide, pourraient expliquer la pureté bactériologique du liquide, ne s'y rencontrent jamais en proportions suffisantes pour jouer ce rôle protecteur ; c'est ainsi, en particulier, que le degré alcoolique est constamment très bas, et que le taux d'acidité est toujours inférieur à celui qui rendrait impossible la survivance des germes du groupe coli. On comprendra aisément la portée de ces remarques si l'on songe à la teneur très supérieure en alcool et à l'acidité bien plus élevée d'autres boissons, telles que le vin et le cidre. C'est ainsi que M. Bodin (1), préoccupé de la possibilité d'une infection possible du cidre par le bacille typhique, a

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 458.

TABLEAU I. — *Analyse chimique de quelques bières flamandes.*

(M. JAVILLIER et R. HAZARD.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Densité.	1007	1008	1010	1012	1009	1011	1012	1012	1012	1023
Densité originelle du moût.	2,78	2,62	2,88	2,62	4,10	3,75	3,26	2,73	3,91	5,74
Titre alcoolique. . .	2°,65	1°,92	2°,30	1°,78	3°,76	3°,38	2°,57	1°,80	3°,52	4,04
Acidité totale (1) (sans CO^2)	0,705	0,740	0,568	0,568	0,686	0,588	0,660	0,588	0,800	0,980
Acidité fixe (1). . . .	0,539	0,470	0,529	0,431	0,636	0,548	0,580	0,529	0,760	0,820
Acidité volatile (1) id.	0,166	0,270	0,039	0,137	0,050	0,040	0,080	0,059	0,040	0,160
Extrait à 100° °/₀₀. .	24,28	28,80	30,68	34,28	35,60	36	36,28	38,40	40,60	75,80
Sucre réducteur (exp. en maltose)	5,90	6,50	10,50	9	8,75	9	8,60	14,50	9,25	16,50
Dextrine (2).	9,02	14,22	14,22	15,30	17,1	18	20,30	16,65	23,40	41,40
Matières azotées (3) .	1,56	1,23	1,92	1,88	1,49	0,875	1,14	1,05	1,14	3,94
Cendres	1,64	1,60	1	1,48	1,28	1,08	1,40	1,60	1,28	2,20
Ac. phosphorique . .	»	0,410	0,370	0,291	0,350	0,320	0,312	0,374	0,312	»
Coloration par l'iode.	Rose faible	Rouge violacé	Rouge violacé	Bleu violacé	Rouge faible	Rouge faible	Rouge faible	Bleu violacé	Rouge faible	Rouge faible
Maltose °/₀ d'extrait.	24,2	22,5	34,2	26,2	24,5	25	23,7	37,7	22,7	21,7
Dextrine id. . .	37,1	49,3	46,3	44,6	48	50	55,9	43,3	57,6	54,6
Mat. azotées id. . .	6,4	4,3	6,2	5,5	4,1	2,4	3,1	2,7	2,8	5,1
Cendres id. . .	6,7	5,5	3,2	4,3	3,6	3	3,8	4,2	3,1	2,9
P^2O^5 °/₀ de cendres .	»	25	37	19,6	27	29	22,2	23,3	24,3	»

(1) Toutes les acidités sont exprimées en SO^4H^2 °/₀₀.

(2) La dextrine est calculée d'après le poids de sucre réducteur, exprimé en glucose, obtenu dans l'hydrolyse chlorhydrique du précipité que donne une partie de bière dans 25 parties d'alcool à 95°.

(3) Les matières azotées sont calculées d'après la quantité d'azote total multipliée par 6,25.

montré très facilement que ce danger était illusoire, l'acidité du cidre achevé, comme celle même du moût qui sert à sa préparation, étant constamment supérieure à 2,6 en acide malique, alors que le bacille d'Eberth ne se développe plus dès que le taux de cet acide dépasse 2 p. 1.000. Nous sommes très loin, on le voit, de trouver dans les résultats de nos analyses de bière les motifs d'une pareille sécurité.

Tableau II

	MAXIMUM	MINIMUM	MOYENNE
Densités originelles	4,30	1,75	2,91
Titres alcooliques	3°,8	1°,3	2°,37
Extraits à 100° °/₀₀	48,6	24,2	36,1
Acidités totales (sans CO^2) (expr. SO^4H^2) .	1,000	0,502	0,700
Maltose	14,50	5,90	9,6

CHAPITRE II

ORIGINES DE NOTRE ENQUÊTE, FAITS CLINIQUES

La bière a eu de tout temps la réputation d'une boisson parfaitement hygiénique. Sa faible teneur en alcool, sa très légère acidité, sa richesse relative en hydrates de carbone et en matières azotées bien assimilables, justifient assez ce jugement favorable. Il ne semble pas que, jusqu'à présent, aucune étude bactériologique ait apporté aucune restriction à des conclusions basées surtout sur des arguments d'ordre chimique. Bien au contraire, les propriétés microbicides de certaines levures, qu'on pensa pendant quelques années, pouvoir utiliser dans la lutte contre les bactéries, et en particulier, dans le traitement de l'acné et de la furonculose, créaient tout naturellement une présomption en faveur d'une boisson dont l'agent de fermentation était doué d'aussi précieuses qualités. Lorsque, d'autre part, les résultats incontestables obtenus par les cures de ferments lactiques ou de laits fermentés, se furent vulgarisés, on se plut à faire remarquer que la bière contenait de nombreux bacilles lactiques. Sans doute, depuis les mémorables *Études sur la fermentation* de Pasteur qui, le premier, avait étudié à la fois le rôle de la levure dans la fermentation et celui des bactéries dans les « maladies de la bière », de nombreux bactériologistes ont signalé l'existence et l'action chimique des germes impliqués dans ces fâcheuses altérations du liquide. Ces maladies et leurs agents sont donc aujourd'hui couramment décrits, sinon bien connus, et les brasseurs savent, dans une large mesure, s'en défendre. Mais jamais l'attention n'a été attirée sur des souillures bactériennes qui, sans compromettre aucunement les qualités de

la boisson, pouvaient mettre directement en péril la santé du buveur. Bien au contraire, bon nombre d'ouvrages de brasserie et de spécialistes réputés en la matière, nient positivement la possibilité même du péril. Les premières analyses de notre laboratoire suscitèrent donc un étonnement profond. « Pour ma part, écrivait à cette occasion le directeur de l'École de brasserie de Nancy, dans une lettre ouverte aux brasseurs de la région flamande, je n'ai jamais pu constater dans la bière ni colibacille, ni bacille d'Eberth, même quand l'eau servant à la fabrication était nettement contaminée par ces germes ; et cependant il y a vingt-deux ans que je m'occupe de brasserie et que notre laboratoire fait sur la bière des recherches chimiques et bactériologiques. »

Les termes mêmes employés par M. Fernbach, directeur de l'École de brasserie de l'Institut Pasteur de Paris, dans une autre lettre ouverte aux mêmes brasseurs, écrite après une sérieuse enquête sur place, témoigneront eux aussi de la nouveauté du fait :

« La présence du B. coli ou colibacille, dans nombre d'échantillons prélevés par le Laboratoire d'armée de Dunkerque, est une réalité incontestable. Le fait a provoqué un profond étonnement chez la plupart de ceux qui connaissent bien la bière et sa fabrication ; mais il est regrettable qu'un premier mouvement de surprise très légitime ait amené quelques personnes à nier sans plus ample informé la réalité des faits. »

Lorsque nous avons commencé notre enquête, il y avait donc un préjugé général, partagé par nous-même, contre l'hypothèse d'une souillure possible de la bière par des bactéries nocives ou suspectes.

*
* *

Bien que les habitants des Flandres fassent de la bière leur boisson favorite, ils ne laissent pas de reconnaître que celle-ci cause parfois des troubles gastro-intestinaux. Tous ceux que nous avons interrogés insistent sur ce fait que ces accidents se produisent surtout pendant la période des grandes chaleurs estivales. Certains se déclarent exposés à ces inconvénients en toutes saisons, mais lorsqu'ils consomment les produits de certaines brasseries déterminées, alors qu'ils boivent impunément

des bières d'une autre origine. Presque toujours, il s'agit de coliques plus ou moins vives, sans phénomènes généraux, sans nausées, sans fièvre, accompagnées de besoins d'évacuation impérieux et répétés, et suivis d'émission de selles molles, rarement diarrhéiques, presque jamais séreuses. Ces accidents cessent en général en un jour ou deux, et ne se reproduisent qu'à la suite d'une nouvelle absorption de liquide.

Il s'agit en somme à peine d'une maladie, tout au plus d'une légère indisposition. Mais les accidents peuvent présenter une forme moins bénigne, rappelant soit une poussée dysentérique, soit un embarras gastrique fébrile, comme nous le montreront deux observations que nous reproduisons plus loin, dans un chapitre consacré à montrer ce qu'on doit conclure de la présence constatée du coli dans une bière déterminée.

Même dans leur forme bénigne habituelle, ces accidents ne pouvaient manquer d'attirer l'attention. Certaines bières les produisent presque à coup sûr, au point que, d'après le témoignage de M. le Dr Ravaut, médecin-chef d'un hôpital de contagieux dans la zone de notre armée, ses infirmiers ne prenaient pas autre chose qu'un peu de bière du pays, lorsqu'ils sentaient le besoin d'un purgatif. Si peu dramatique que soit en ces cas l'action de la bière, elle ne peut passer inaperçue en raison même de sa régularité. D'autre part, il semble bien que cette action s'exerce avec une netteté particulière sur des tubes digestifs en état de moindre résistance, et il n'est pas étonnant que des troupes nouvellement débarquées dans la région, nullement accoutumées à la boisson favorite du pays, et par surcroît, surmenées, aient fourni de nombreux exemples d'accidents significatifs.

L'un des premiers cas qui attirèrent l'attention du commandement fut celui d'une popote d'officiers, dont une bonne part se trouvèrent simultanément atteints de coliques, avec épreintes, selles molles et fréquentes; bref, d'un syndrome intestinal analogue à celui que nous signalions plus haut comme souvent consécutif à l'ingestion de la bière. L'interprétation des faits était d'autant plus aisée que, un même régime alimentaire étant par ailleurs commun à tous, ceux-là seuls furent malades qui avaient consommé de la bière. C'est à cette occasion que, pour la première fois, le colibacille fut décelé par l'analyse bactériolo-

gique, et que sa présence fut interprétée comme le signe d'une souillure grave de la boisson.

Un peu plus tard, un médecin divisionnaire signala au laboratoire d'armée des bières débitées par les estaminets d'un village flamand occupé par de nombreuses troupes. Il avait, en effet, observé chez ses soldats un grand nombre d'indispositions de type gastro-intestinal; et comme par ailleurs leur régime ne semblait avoir comporté rien de suspect, il tendait à incriminer la bière, consommée d'autant plus abondamment que tous les puits et citernes étaient gravement souillés; et il soupçonnait même les débitants d'étendre leurs bières de ces eaux suspectes, et de les infecter par là même.

C'est dans ces conditions et sur sa demande que fut pratiquée au laboratoire d'armée la première série d'examens, origine de cette enquête.

La première hypothèse à examiner était celle d'une falsification chimique. Les analyses de M. Javillier, chimiste du laboratoire, l'éliminèrent immédiatement. Par contre, guidé surtout par le désir de déceler l'addition possible d'eau impure à une bière supposée saine, nous pratiquâmes la recherche du colibacille. Il était présent, en quantités considérables, dans presque tous les échantillons. Il nous restait, pour prouver l'intervention frauduleuse du débitant, à montrer la pureté bactériologique de la bière à sa sortie des brasseries; et nous fîmes dans celles-ci une nouvelle série de prélèvements. C'est ainsi que nous fûmes amené à établir un fait d'une importance évidente, non seulement ignoré jusqu'ici, mais explicitement nié par la majorité des spécialistes en matière de brasserie : la bière des brasseries flamandes est, dans bon nombre de cas, souillée de colibacille avant même sa livraison.

CHAPITRE III

DÉMONSTRATION DE LA PRÉSENCE DU COLI DANS CERTAINES BIÈRES FLAMANDES

§ 1. — *Technique des analyses.*

Le résultat de cette première série d'analyses était, nous le répétons, contraire non seulement à l'opinion courante, mais même aux textes des manuels de brasserie, et aux enseignements des écoles spéciales.

Aussi, afin d'éviter toute cause d'erreur, avons-nous jugé indispensable d'appliquer à l'isolement, à l'identification et à la numération du colibacille, une méthode tout à fait rigoureuse qui est une simple variante, avantageuse à notre avis, de celle conseillée par M. le professeur Vincent pour la recherche de colibacille dans les eaux. Nous avons déjà exposé ailleurs cette technique. Ne l'ayant pas modifiée depuis lors, nous reproduisons textuellement cet exposé (1).

Nous avons d'abord tenté l'*isolement du bacille* en procédant à deux passages successifs en milieu phéniqué selon le procédé classique du professeur H. Vincent : une quantité variable de bière était ensemencée en eau peptonée phéniquée à 0,85 p. 1.000, proportion obtenue aisément en ajoutant à 2 centimètres cubes du mélange I goutte (au trentième) de solution phéniquée à 5 p. 100. Lorsque le milieu s'était troublé nettement après quatorze à seize heures de séjour à l'étuve à 41°5, une anse de platine de la culture était reportée dans un second tube d'eau peptonée phéniquée au même taux. Ce tube devait, s'il s'agissait

(1) *Revue d'Hygiène et de Police sanitaire*, janvier 1916, p. 57.

du coli, présenter un trouble très net après un séjour de six heures à l'étuve à 41°5. Il était, au bout de ce temps, repiqué en eau peptonée non phéniquée, et cette dernière culture servait de souche pour l'identification ultérieure du coli. Ce procédé, très satisfaisant pour l'isolement du coli dans les eaux suspectes, présentait pour l'étude des bières certains inconvénients.

Le double passage en milieu phéniqué était insuffisant pour éliminer bon nombre des germes qui vivent dans les bières. Sans parler du *B. subtilis*, qui ne constitue pas une cause d'erreur sérieuse, tant il est facile à reconnaître, nous retrouvions souvent une série de germes beaucoup plus voisins du coli qui ne pouvaient être séparés de celui-ci que par culture sur milieu solide et identification individuelle des colonies.

La technique suivante, à laquelle nous nous sommes arrêté, nous épargne des pertes de temps et des repiquages inutiles, tout en nous assurant la certitude d'obtenir des cultures de coli rigoureusement pures. Notre premier ensemencement est fait en eau peptonée phéniquée comme dans la technique précédente. Mais, lorsqu'un trouble net s'est produit en quatorze ou seize heures, nous substituons, au deuxième passage en milieu phéniqué, un ensemencement direct en stries sur milieu solide coulé en boîtes de Pétri. Nous utilisons dans ce but des milieux colorés assez fortement antiseptiques : soit la gélose d'Endo, soit la gélose de Drigalski Conradi. Ces milieux électifs ayant éliminé la très grande majorité des bactéries qui ont pu pulluler avec le coli à 41 degrés et en milieu phéniqué, il nous est facile de choisir, d'après leurs caractères macroscopiques et d'après le virage du milieu, les colonies bien isolées de coli que nous repiquons en eau peptonée. C'est le milieu de Drigalski que nous utilisons régulièrement en raison de la rapidité et de la netteté plus grandes du virage.

D'une bière ensemencée un soir en eau peptonée phéniquée, nous obtenons donc le lendemain matin une culture impure de coli et celle-ci, repiquée sur Drigalski, nous fournit en moins de trente-six heures les colonies pures qui seront soumises aux *épreuves d'identification*.

La rapidité du développement en eau peptonée phéniquée à 41 degrés, l'aspect des colonies sur les milieux solides électifs employés pour l'isolement du germe, constituent déjà des carac-

tères importants pour le diagnostic positif de l'espèce microbienne. Les cultures obtenues à partir des colonies développées sur Drigalski ne sont identifiées au colibacille que si elles présentent tous les caractères typiques du germe : par examen microscopique à l'état frais et après coloration, par cultures, par recherche des réactions biochimiques les plus importantes.

L'examen des cultures et celui des préparations colorées n'offrent rien de spécial. Examinées entre lame et lamelle les cultures en eau peptonée montrent souvent des bacilles médiocrement mobiles ou même immobiles. Nous serions parfaitement en droit de négliger cette légère particularité dans tous les cas où tous les autres caractères sont ceux d'un coli typique, car les variétés immobiles ou peu mobiles du coli sont bien connues. Mais nous avons pu nous convaincre que cette immobilité même n'était presque toujours que transitoire. L'interprétant bien plutôt comme une modification biologique due au milieu que comme une caractéristique d'une race spéciale de coli, nous avons cherché à rendre à nos germes leur mobilité perdue. Nous y avons réussi dans la majorité des cas, tantôt par l'inoculation au cobaye, tantôt par un passage de vingt-quatre heures en bile. En repiquant en eau peptonée le sang du cœur dans le premier cas, la bile ensemencée dans le second, nous avons souvent obtenu en eau peptonée des bacilles très mobiles.

Parmi les réactions biochimiques, nous avons retenu comme essentielles et recherché dans tous les cas les suivantes : fermentation de la lactose avec virage du milieu au rouge sur gélose de Drigalski ; — décoloration, virage et coagulation du lait tournesolé ; — éclatement et virage au jaune fluorescent de la gélose glucosée au rouge neutre ; — absence de liquéfaction de la gélatine ; — réaction de l'indol très nette dans l'eau peptonée.

Sur plusieurs échantillons, nous avons multiplié les épreuves, cultivé le bacille sur gélose au plomb et essayé la fermentation de nombreux sucres : saccharose, glucose, lactose, maltose, mannite, dulcite et arabinose en milieu de Barsiekow. Ces épreuves supplémentaires n'ont jamais fait que confirmer le diagnostic porté par la première série de réactions. Dans la généralité des cas, nous nous en sommes tenus à celles-ci.

Nous avons inoculé à l'animal un certain nombre de ces colibacilles extraits des bières : 5 centimètres cubes en bouillon

injectés dans le péritoine du cobaye le tuent en vingt-quatre heures par septicémie; le colibacille peut être aisément isolé du sang du cœur et souvent ce passage chez l'animal a rendu au microbe sa mobilité. Ainsi, le colibacille des bières ne peut-il être considéré comme un saprophyte banal, puisque, à assez forte dose il est vrai, il se montre extrêmement pathogène pour l'animal.

La *numération* des colibacilles se fait d'une façon très simple et très classique, le premier ensemencement de l'échantillon en expérience étant fait dans une série de tubes dont chacun reçoit une quantité connue de bière. Souvent, nous avons opéré sur une échelle relativement étendue, ensemençant par exemple : I goutte, II gouttes, V gouttes, X gouttes, 1 centimètre cube, 2 centimètres cubes, 10 centimètres cubes, 50 centimètres cubes. Dans la majorité des cas, nous nous sommes contenté d'ensemencer deux tubes. Cette simplification de la technique se justifie par les considérations suivantes.

Nos analyses étaient destinées à renseigner le commandement qui signalait aux troupes, comme suspectes, les bières contenant plus de 1.000 coli par litre. Il était donc, à ce point de vue, inutile, dès l'instant où était atteint le chiffre minimum qui entraînait la sanction, d'évaluer le chiffre réel, dont la connaissance n'eût en rien modifié celle-ci. Pour la même raison, nous ne recherchions pas en général les quantités de coli inférieures à 500 par litre, puisque cette évaluation n'aurait eu aucune portée pratique. En réalité, comme nous l'avons établi pour notre édification personnelle, les bières contenant très peu de colibacilles (0 à 500) sont rares. Elles en renferment en général, ou pas du tout, ou un chiffre très élevé (plusieurs centaines de mille par litre dans de nombreux cas).

§ 2. — *Interprétation des résultats.*

La constatation dans une bière, par les procédés indiqués plus haut, de quantités de colibacilles égales ou supérieures à 1.000 par litre, entraînait, nous l'avons dit, le classement de cette boisson comme suspecte et son interdiction aux troupes. Cette mesure se justifiait comme la simple application à la bière, d'une règle constamment adoptée, au moins dans les laboratoires d'armée, pour l'appréciation des eaux potables. Sans être, en

effet, pathogène par lui-même, le colibacille doit être considéré comme l'indice d'une souillure bactérienne sérieuse des eaux ou produits alimentaires où il se rencontre en abondance. Hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, apporté au sol par leurs déjections ou leurs cadavres, il est, dans les eaux où on le rencontre en abondance, le témoin d'une communication directe ou indirecte, par ruissellement ou par infiltration, avec les couches superficielles du sol chargées de ces déchets organiques. Cela suffit à rendre suspecte une source ou un puits ; puisque ces mêmes déchets peuvent provenir d'individus atteints de maladies infectieuses; et que, là où s'est glissé le colibacille, pourraient s'insinuer, le cas échéant, ses commensaux accidentels : bacilles typhiques et paratyphiques, vibrion cholérique, etc. On ne peut cependant négliger la notion de la *quantité* des colibacilles présents, parce que de minimes souillures, venant par exemple des poussières aériennes, peuvent introduire occasionnellement de petites quantités de germes dans un puits ou dans une source bien isolés par ailleurs. D'où, la nécessité d'établir une sorte de graduation dans la pollution : graduation basée sur le chiffre des coli calculés par litre d'eau. Le chiffre de 1.000, que nous avons adopté pour les bières, répond, dans la table de Miquel, destinée aux analyses d'eaux, à l'appréciation suivante : « 1.000 à 10.000 coli = eau médiocre » et, dans celle du Prof. Vincent : « Eau mauvaise ou très mauvaise, impropre à la boisson (eau de rivière, de puits contaminés, etc.). »

A un moment où l'accumulation de nombreuses troupes rendait toute menace possible d'épidémie particulièrement grave; en une région où presque tous les puits, atteignant la nappe d'eau superficielle à des profondeurs variant de $0^{m},50$ à 5 ou 6 mètres, se montraient inutilisables; au moment où tout était mis en œuvre pour fournir aux soldats des boissons saines : eau stérilisée, infusions, etc., il ne pouvait pas y avoir d'hésitation sur l'application aux bières colifères, de règles appliquées aux eaux de consommation. On ne pouvait attendre, pour agir, les résultats de notre longue enquête. D'ailleurs si celle-ci, comme on le verra, nous a ultérieurement permis de pénétrer le mécanisme assez spécial de l'infection des bières, elle a aussi justifié assez pleinement les mesures prises en vertu de cette assimilation.

§ 3. — ***Statistique du premier trimestre de l'enquête.***

Bien que nos analyses portent aujourd'hui sur plus de 560 échantillons, nous ne saurions les réunir dans une seule statistique. Nous ne donnerons tout d'abord que les résultats correspondant au trois premiers mois, à dater de notre série initiale d'examens (juillet 1915). Il nous permettront d'apprécier, au seul point de vue de la présence ou de l'absence du coli-bacille, ce qu'était à cette date la pureté bactériologique moyenne de la bière des Flandres. Nous pourrons, à la fin de cette étude, montrer les heureuses modifications qu'ont apportées sur ce point, non seulement les conditions de température favorables créées par la saison froide, mais les efforts intelligents d'un très grand nombre de brasseurs.

Du 7 juillet au 7 octobre 1915, nous avions examiné 240 échantillons de bière, prélevés soit à la brasserie, soit chez le débitant. Les résultats comportaient l'indication de la présence ou de l'absence du coli ; les quantités égales ou supérieures à 1.000 par litre entrant seules en compte. Nous ajoutions la mention du chiffre total des germes de toutes sortes, contenus dans 1 centimètre cube ; chiffre obtenu par l'ensemencement de I goutte et de II gouttes, en boîtes de gélatine et par la numération des colonies. Celles-ci n'étaient pas individuellement identifiées et nous nous bornions à signaler, le cas échéant, l'abondance des espèces liquéfiantes.

Sur 240 échantillons, 165, soit un peu plus des 2/3, avaient dû être déclarés suspects. La présence de quantités importantes de coli, loin d'être exceptionnelle, semblerait donc, si l'on s'en rapporte à ces chiffres, un fait presque général. Mais, dès les précédentes publications de notre laboratoire, nous avions fait nos réserves contre une telle interprétation.

« Cette statistique, disions-nous, prouve que la souillure microbienne de la bière est très fréquente, et rien de plus. Personne ne songe à prétendre que la boisson favorite des Flandres est, pour les deux tiers de sa consommation journalière, suspecte au point de vue bactériologique. Tout d'abord nos analyses ont été répétées à plusieurs reprises dans les mêmes brasseries et les mêmes estaminets, et avec d'autant plus d'insistance que

des résultats défavorables faisaient sentir la nécessité d'une surveillance plus active. Ensuite et surtout, le débit d'une grande brasserie bien outillée dépasse souvent à lui seul celui de dix médiocres installations de campagne. Or, comme il était facile de le prévoir, le pourcentage des résultats satisfaisants est bien plus élevé pour les établissements des villes (72 p. 100 pour Dunkerque), que pour les brasseries de villages (57 p. 100), et, si l'on pousse l'enquête plus loin, on se rend compte que, dans les maisons pourvues d'un outillage suffisant, il suffirait d'une surveillance attentive de la fabrication pour produire à coup sûr une bière pure, et accentuer encore l'écart des deux statistiques. La masse totale de la bière saine débitée principalement par les maisons les plus importantes dépasse donc dans des proportions considérables celle des bières impures, et l'on ne s'étonnera pas d'apprendre que la statistique spéciale des estaminets est beaucoup meilleure que celle des brasseries, puisque chaque fabrique importante fournit de nombreux débits. Mais, si ces considérations retirent à nos recherches un peu de leur intérêt au point de vue de l'alimentation publique en général, on nous permettra de remarquer qu'elles soulignent l'urgence des décisions prises par le commandement, puisque les statistiques locales les plus inquiétantes visent précisément la zone des petits villages où cantonnent les troupes.

DEUXIÈME PARTIE

INFECTION ET ÉPURATION D'UN BRASSIN

CHAPITRE PREMIER

INFECTION DU BRASSIN

§ 1. — *Hypothèses sur l'origine et le mécanisme de la souillure.*

Bien que nos recherches fussent, à cette phase de notre enquête, limitées à l'établissement, pour chaque échantillon, des seules données spécifiées plus haut : présence ou absence du coli, chiffre global des germes, rareté ou abondance des espèces liquéfiantes, nous avions déjà, en rassemblant nos résultats, été frappé de quelques faits assez généraux qui devaient nous aider à orienter nos recherches ultérieures.

Le premier de ces faits avait été établi à l'aide d'une épreuve supplémentaire consistant à étaler une seule goutte (1 c.c./30) de bière sur une boîte de gélose de Drigalski, à identifier et compter les colonies de coli développées par culture de cette goutte et à fixer par là le nombre de colibacilles contenus par litre. En opérant ainsi sur un grand nombre d'échantillons, nous vîmes ce nombre atteindre des valeurs fort élevées, plusieurs centaines de mille, par exemple ; et cela d'une façon non pas accidentelle, mais très fréquente. Les chiffres élevés sont même, pourrait-on dire, la règle. Lorsqu'une bière contient du coli, il est plus fréquent de voir une goutte en fournir de nombreuses colonies que de la voir ne donner naissance à aucune culture. Dans les deux tiers des cas au moins, une bière

où nous signalions l'existence de 1.000 coli au litre, en contenait au minimum 15.000. Et non seulement cette prédominance des résultats extrêmes se remarquait dans notre statistique générale, mais encore dans plusieurs brasseries nous avons vu une série de prélèvements successifs montrer tantôt une bière rigoureusement pure, tantôt des échantillons capables de fournir de riches cultures de coli par ensemencement d'une seule goutte. Les types de transition existent, mais sont peu fréquents.

Lorsque, d'autre part, nous mettions en relation le chiffre de coli calculé par litre et celui des bactéries de toute sorte contenues dans un centimètre cube, nous rencontrions souvent une formule assez particulière. Sans doute, dans un grand nombre de cas, nos résultats n'étaient nullement en opposition avec ceux qu'on aurait pu obtenir en opérant sur des échantillons d'eaux. Une bière sans colibacille est, en général, une bière pauvre en germes, et une bière où le colibacille pullule, contient souvent des germes innombrables. De même, alors que les bactéries liquéfiantes sont relativement rares dans les bières, il est de règle que les échantillons où elles sont nombreuses soient riches également en colibacilles ; et une bière contenant moins de 1.000 germes par centimètre cube est, en général (46 fois sur 49), exempte de coli. Ainsi donc, dans les cas extrêmes, les résultats ne sont pas sans analogie avec ceux que fourniraient des analyses d'eaux.

Mais il existe une abondante classe de types intermédiaires, où cette analogie ne se soutient plus. Un grand nombre de bières, très riches en coli, ne développent en effet, en gélatine, qu'un chiffre de germes correspondant seulement à quelques milliers par centimètre cube, alors qu'il est de règle de trouver, dans les eaux pareillement chargées de colibacilles, une quantité innombrable de bactéries, pour une bonne part liquéfiantes.

En présence de ces constatations, nous arrivions aux conclusions suivantes, qui devaient diriger, dès le début, les recherches de notre laboratoire :

« Tous ces faits doivent nous induire à penser que la bière ne se souille pas de coli, ni, sans doute, d'autres bactéries, à la manière d'une eau courante, qui se contente de dissoudre des masses bacillifères (terre, poussières, matières organiques, etc.) et ne se prête que peu ou pas à la pullulation des germes. S'il en

était ainsi, en effet, on comprendrait mal l'étonnante richesse en coli de certains échantillons ; on devrait rencontrer tous les degrés de souillure par le coli, et non pas une majorité de types extrêmes ; on observerait sans doute, entre les bières issues de brassins successifs exécutés d'une façon presque identique par une même maison, un passage insensible des bières pures aux bières gravement souillées, au lieu de voir la pureté complète alterner sans transition avec la pollution grave. On ne devrait pas s'attendre enfin à trouver si fréquemment, entre le chiffre des seuls colibacilles et celui des germes en général, un proportion si différente de celle observée habituellement dans les eaux suspectes. »

Toutes ces singularités s'éclaireraient au contraire, si nous pouvions concevoir qu'à un moment quelconque, le coli s'est comporté dans la bière comme dans un véritable milieu de culture ; qu'il s'y est *développé* jusqu'à atteindre des chiffres très élevés ; mais que des modifications chimiques ou biologiques du milieu ont réussi, *tantôt à le détruire radicalement*, *tantôt à arrêter simplement sa multiplication*, sans porter une atteinte plus grave à sa vitalité. C'est là, pour le moment, une simple hypothèse, et nous prions simplement le lecteur de retenir les résultats généraux établis par nos statistiques.

§ 2. — *Survivance et multiplication du coli dans la bière.*

La présence de colibacilles en quantités considérables dans des échantillons de bière, pris soit à l'estaminet, soit à la brasserie, étant établie avec une entière certitude, nous nous sommes préoccupé tout d'abord de préciser le moment et le mécanisme de l'infection. Déjà nos statistiques, en nous montrant que les bières prélevées à la brasserie étaient au moins aussi souvent souillées de coli que celles provenant d'un débit, nous permettaient de supposer que la contamination devait avoir lieu au cours même de la fabrication. Mais nous ne pouvions mettre *a priori* hors de cause toutes les possibilités de souillure après livraison : comme, par exemple, l'addition par le débitant, d'eaux souillées à une bière pure; et

d'autre part, à la brasserie même, des manipulations du même genre pouvaient intervenir entre le moment où la bière, à la fin de la clarification, devait être considérée comme achevée, et celui où elle était expédiée au débitant. Une série de recherches devait nous apprendre quel serait le sort du coli introduit dans une bière achevée.

Nous devions tout d'abord examiner la valeur d'une opinion assez courante dans le monde de la brasserie, et soutenue par quelques spécialistes en la matière : la bière tuerait régulièrement et rapidement les germes pathogènes qu'on y ensemence, et le coli n'échapperait pas à la règle.

Au moins en ce qui concerne la bière des Flandres, cette affirmation est fausse. Nous avons fait, à ce sujet, deux séries d'expériences. Dans la première, nous ensemencions du coli dans des bières qui en avaient été vérifiées exemptes: dans la deuxième, nous prenions des échantillons souillés de coli et nous les ensemencions de bacille typhique. Nous évitions ainsi de les stériliser préalablement, ce qui nous eût exposé, soit à modifier la composition chimique du liquide, soit à détruire d'hypothétiques substances bactéricides.

Dans tous les cas, nous pratiquions de très larges ensemencements : X, XV ou XX gouttes de culture en bouillon par exemple, afin d'être sûr que, même en l'absence de toute multiplication des germes ensemencés, chaque goutte ou chaque anse de liquide contiendrait au moins quelques bacilles.

La série des *bières non colifères* nous a donné des résultats assez inconstants.

Quelques échantillons se sont montrés extrêmement bactéricides, soit pour le coli, soit pour l'Eberth. Dans l'un d'eux, ensemencé de XX gouttes de culture à 9 h. 30, nous ne trouvons plus de coli vivant à 13 h. 30, ni par le repiquage direct sur Drigalski, ni même par l'ensemencement large à la pipette en eau peptonée.

Deux autres échantillons, dont l'un était une bière lorraine prise comme témoin, se débarrassaient régulièrement de leur coli en vingt-quatre ou quarante-huit heures. Les résultats étaient identiques pour les bières maintenues à l'étuve ou à la température du laboratoire après l'ensemencement.

Différentes souches de coli cultivées à partir de bières colifères,

d'eaux souillées, de matières fécales, n'ont pas mieux résisté les unes que les autres. S'il y a entre elles une différence de vitalité, elle est plutôt en faveur du coli fécal, et ne se chiffre guère que par une survie supplémentaire de quelques heures. L'Eberth, dans ces échantillons, se comporte sensiblement comme le coli.

Cette disparition rapide des germes surajoutés représente, pour les bières exemptes de coli, le cas général. Mais elles sont très loin de manifester infailliblement ce pouvoir bactéricide. A plusieurs reprises, nous avons pu en ensemencer de coli ou d'Eberth et retrouver ces germes vivants plusieurs jours après. La plus longue survie constatée a été, il est vrai, de seize jours seulement. Mais les bières dont il s'agit ici sont réputées de petite conservation et habituellement consommées bien avant d'avoir atteint ce délai.

Les germes introduits dans les bières reconnues *préalablement souillées de coli* semblent avoir encore moins de chances d'être éliminés. Tandis que pour les bières pures, leur disparition rapide représentait le cas général, elle est ici presque l'exception, et nous trouvons tous les délais depuis quarante-huit heures jusqu'à quinze et dix-huit jours. Et ici encore, il s'agit d'un délai relativement très long par rapport à la durée de la conservation du liquide, puisque, le plus souvent, c'est seulement après avoir vu des voiles de levures sauvages ou de mycodermes couvrir sa surface, que nous avons constaté la disparition du germe ensemencé.

En résumé, les bières livrées à l'acheteur exemptes de coli ne sont pas régulièrement à l'abri d'une contamination secondaire massive : les bières déjà infectées sont sans défense contre celle-ci aussi longtemps au moins qu'elles sont propres à la consommation.

CHAPITRE II

LIEU, MOMENT, MÉCANISME ET MARCHE DE L'INFECTION DU BRASSIN

§ 1. — *La souillure initiale est réalisée à la brasserie.*

L'infection d'une bière déjà clarifiée, par des *germes introduits secondairement*, reste donc une éventualité admissible, et nous pourrions accorder que, par exemple, le transport du liquide dans des tonneaux malpropres ou l'addition d'une certaine quantité d'eau impure puisse la réaliser. Mais, en fait, les choses ne se passent certainement pas ainsi. Nous savons que les bières souillées de coli en contiennent des quantités presque toujours considérables, presque jamais médiocres ; et déjà cette remarque nous avait fait songer à la pullulation probable de ce germe dans la bière. Cette impression acquiert la valeur d'une certitude, si nous songeons que les eaux les plus profondément souillées acquièrent rarement un taux de coli analogue à celui que nous avons enregistré pour beaucoup de nos échantillons. La dilution d'un volume même notable de ces eaux dans une masse très supérieure de bière ne pourrait donc en aucun cas suffire à expliquer les chiffres constatés de colibacilles, si ces germes ne se multipliaient dans le mélange.

Or il résulte de toutes nos observations, que le colibacille *peut survivre* dans la bière achevée, mais *ne s'y multiplie jamais* d'une façon sensible. Fréquemment, ayant ensemencé des colibacilles, des bacilles typhiques ou paratyphiques dans divers échantillons, nous les avons vus se raréfier et disparaître. Assez souvent cette raréfaction était lente, et cette disparition tardive. Mais jamais nous n'avons pu établir qu'il y ait eu augmentation nette du nombre des germes. Cela est vrai non seu-

lement des germes ensemencés dans une bière achevée, mais de ceux que notre premier examen montrait préexistants dans celle-ci. Il n'y a, à ce point de vue, aucune différence entre les uns et les autres : si les uns tendent à disparaître, les autres les suivent; et jamais ni les uns, ni les autres, n'ont nettement paru pulluler.

La souillure des bières par le colibacille, telle que nous l'avons observée, est donc certainement *antérieure à la clarification*. C'est dans la brasserie même que nous devons préciser le moment et les conditions de l'infection.

§ 2. — *Moment et mécanisme de l'infection du moût.*

Cette recherche se limite tout naturellement à une période très courte, de quatre à cinq jours au plus, dans la fabrication d'un brassin. Les souillures qui ont pu atteindre les matières premières mises en œuvre par la levure : eau, malt, houblon, importent peu. Le moût, en effet, est soumis en chaudière à une ébullition prolongée, de quatre à six heures suivant les cas, rarement moins et souvent plus, à une température dépassant légèrement 100 degrés. Il sort donc de là pratiquement stérile; et, en tous cas, ne contenant pas de bacilles vivants. C'est à partir de sa sortie de la chaudière qu'il nous faut le suivre en relevant au passage les causes possibles de contamination.

Le moût préparé dans la chaudière doit être mélangé avec la levure qui le fera fermenter. Mais ce mélange, qui se fait en général dans une vaste cuve (cuve guilloire), n'est possible que si le liquide a été préalablement ramené à une température qui ne risque pas d'altérer les levures; et qui, au contraire, leur permette d'entamer la fermentation aussitôt que possible. Pratiquement, on cherche à obtenir dans la cuve une température voisine de 20 degrés au plus, la fermentation, dans le type de bière envisagé ici, se faisant à une température comprise entre 16 et 20 degrés.

Entre la chaudière et la cuve guilloire, s'interposent donc des appareils destinés à refroidir le moût : bacs, réfrigérants, souvent les uns et les autres. Puis les levures sont versées dans la cuve et mélangées intimement à la liqueur sucrée. Nous avons

montré au début de ce travail comment le mélange était ensuite réparti en fûts. Nous avons décrit la marche de la fermentation, l'expulsion des levures et le remplissage régulier des tonneaux; puis la clarification, ou collage.

De toutes les manipulations subies par le moût, cette clarification est la seule qui paraisse susceptible de diminuer le nombre de germes qu'il contient, en les entraînant mécaniquement dans le coagulum gélatineux. Nous avons vérifié que les solutions de matière gélatineuse dans l'acide tartrique ou sulfureux ne pouvaient, en aucun cas, apporter avec elles les germes suspects. Toutes les autres opérations, par contre, représentent de multiples et très inégales occasions de souillures.

Le moût peut s'infecter sur les bacs ou dans les plis du réfrigérant; la levure peut, dans la cuve guilloire, introduire une foule de germes suspects. Les récipients, les tuyaux qui servent à répartir le mélange dans les tonneaux, et ces derniers eux-mêmes, peuvent être infectés ou contenir quelques restes d'eau impure. Les remplissages opérés durant la fermentation peuvent introduire de nouveaux microbes, tandis que les poussières peuvent descendre par l'ouverture de la bonde.

En réalité, de ces souillures multiples, deux seules sont à retenir : 1° parce qu'elles sont massives; 2° parce qu'elles se produisent au seul stade de la fabrication où elles peuvent être vraiment dangereuses : nous voulons parler de l'infection par les appareils de réfrigération, et de celle due à des levures impures.

*
* *

Nous avons à plusieurs reprises, et dans des fabriques différentes, suivi l'évolution d'un brassin par des prélèvements quotidiens ou biquotidiens, qui nous permettaient de constater le début et la marche de l'infection par le coli. Dans tous les cas, ce germe était présent en quantités considérables dans la cuve guilloire, avant tout début de fermentation, et nous pouvions nous assurer que les voies d'apport étaient doubles; d'une part, le moût prélevé au bas du réfrigérant contenait déjà des quantités considérables de coli, et d'autre part, la levure était elle-même profondément souillée dans quelques cas, incomplètement pure dans d'autres.

Notre laboratoire a précisé, dans un travail antérieur, le mécanisme de cette pollution des moûts et des levures. Nos constatations plus récentes n'ont fait que corroborer nos premières observations, et nous n'avons rien à changer à celles-ci.

La souillure du moût s'effectue pendant la période de refroidissement qui lui est imposée entre sa sortie de la chaudière et son entrée dans la cuve guilloire. Mais les risques sont très variables suivant le mode de réfrigération employé. D'une façon générale, les brasseurs de la région du Nord emploient l'un des trois procédés suivants :

1° Refroidissement par étalement en couche mince sur de vastes *bacs* d'où le moût passe directement dans la cuve de fermentation ;

2° Refroidissement par passage sur un *réfrigérant* constitué essentiellement par un système fermé à l'intérieur duquel circule de l'eau froide, tandis que le moût descend sur la surface externe. Nous n'avons jamais vu employer dans les brasseries de notre région les réfrigérants fermés, dans lesquels le moût circule à l'intérieur ;

3° Refroidissements successifs d'abord *sur bac*, *puis sur réfrigérant.*

Les avantages de ces divers procédés peuvent être discutés à de nombreux points de vue et en particulier à celui de l'enrichissement du moût en oxygène, nécessaire au bon développement des levures. Nous ne pouvons les étudier ici que comme origines possibles de souillures par le coli. A première vue, la réfrigération *par bacs* ouverts, exposés par suite à toutes les poussières, semble particulièrement dangereuse. Elle l'est en réalité, mais seulement dans certaines conditions. En effet, le bac, entre les différents brassins, est extrêmement facile à nettoyer ; et de plus, au moment où il est rempli, chacune de ses parties est recouverte d'un moût encore voisin de la température d'ébullition. Même malpropre, il est donc incapable de souiller le moût. Seules donc sont dangereuses les poussières qui se déposent sur celui-ci à partir du moment où sa température devient compatible avec la vie des bactéries. C'est pourquoi les brasseurs disent couramment que le danger d'infection pour le moût commence au moment où il atteint 60 degrés. Cette observation, valable pour les germes responsables des maladies des

bières, l'est nécessairement aussi pour le coli. Le moût ne devant être introduit dans la cuve de fermentation qu'à une température comprise, en moyenne, entre 16 et 20 degrés, la durée de la période dangereuse est donc en rapport étroit avec la température ambiante; dans les petites brasseries de campagne, utilisant exclusivement les bacs, une nuit entière suffira à peine durant les chaleurs de l'été à amener un brassin à une température convenable. C'est donc souvent pendant un laps de temps de douze à quatorze heures ou plus que toutes les poussières se déposeront dans un véritable milieu de culture sucré et c'est en vain que, pour raccourcir ce délai, le brasseur ensemencera prématurément sa levure dans un moût voisin de 25 degrés, car à cette température, peu favorable à leur développement, les levures lutteront difficilement contre les bactéries. En hiver par contre, la période dangereuse sera très écourtée par la chute rapide de la température du moût; les risques d'infection par voie aérienne seront très diminués par la raréfaction des poussières et la levure entamera la fermentation à une température favorable. Aussi est-ce sans surprise que nous avons vu des brasseurs de campagne qui utilisent exclusivement des bacs, et qui avaient produit en été des bières fortement souillées, nous fournir des échantillons très améliorés ou même irréprochables dans la saison froide. L'un d'eux qui, jusque vers cette époque, abrégeait le refroidissement de son moût par un passage sur un petit réfrigérant, a supprimé cette dernière opération et livre actuellement une bière saine. Le bac se montre en somme, au point de vue de l'infection par les bactéries, un instrument inconstant qui, suivant la température élevée ou basse, agit lentement et mal, ou rapidement et bien.

Dans les *procédés de refroidissement mixtes*, où le moût aéré et légèrement refroidi sur bac atteint le sommet du réfrigérant à une température encore trop élevée pour permettre la vie des bactéries, il va de soi que le réfrigérant seul doit être tenu pour responsable des souillures bactériennes du moût. Nous ne devons donc, au point de vue de l'infection colibacillaire, faire aucune distinction entre les procédés de refroidissement mixte et ceux qui utilisent *le seul réfrigérant*.

Nous n'avons, disions-nous, rencontré dans la région aucun type de réfrigérant où le moût circulât à l'intérieur et l'eau

froide à l'extérieur. Tous les modèles que nous avons vus se ramenaient à deux types. L'un (type Baudelot), constitué par une série de tubes horizontaux superposés, à l'intérieur desquels l'eau froide suit son trajet ascendant, tandis que le moût descend à la surface externe des tubes; l'autre (type Lawrence) dans lequel les deux parois principales d'une vaste boîte verticale extrêmement plate présentent une série de plis horizontaux alternativement saillants et rentrants. Ici encore, l'eau froide circule à l'intérieur, le moût à l'extérieur. Au point de vue qui nous intéresse, le meilleur type est celui qui se prête le mieux au nettoyage et certains réfrigérants du type Baudelot, à tubes très espacés, permettant à la brosse de passer entre eux, se prêtent remarquablement à cette opération. Par contre, certains appareils tubulaires à tubes serrés, certains réfrigérants de type Lawrence à plis étroits et profonds offrent aux microbes un abri trop sûr.

Cependant, le simple examen de l'appareil ne peut permettre de comprendre la souillure profonde observée par nous dans certains moûts recueillis au bas du réfrigérant. Comment un liquide stérile dans la gouttière supérieure peut-il s'être chargé d'un nombre de germes aussi élevé que celui révélé par plusieurs de nos analyses, pour avoir parcouru en un temps qui ne dépasse guère une demi-minute un trajet à peine supérieur à 2 mètres pour les plus grands appareils? Comment le passage des premiers litres de liquide n'entraîne-t-il pas les poussières déposées dans les recoins et replis du réfrigérant et comment le moût peut-il rester chargé de quantités de germes presque aussi élevées qu'au début alors que plusieurs hectolitres ont déjà balayé les mêmes surfaces? Il peut s'agir d'une infection purement accidentelle par communication de l'eau circulant à l'intérieur des tubes avec le moût qui descend à leur surface; encore faut-il que cette eau soit elle-même sérieusement souillée pour que sa dilution dans le moût confère à celui-ci une teneur élevée en germes. Un brasseur, dans le moût duquel nous avions retrouvé à deux reprises une quantité de coli supérieure à 1.000 par litre avec de nombreux autres germes, a découvert et supprimé une semblable fuite. Mais, après avoir analysé de nouveau le moût et l'avoir trouvé, à deux reprises, pratiquement stérile, nous pensons que les nettoyages sérieux de l'appareil avaient eu autant d'impor-

tance que l'obturation de la fuite, car l'eau de réfrigération était plutôt médiocre que mauvaise.

Le mécanisme de cette souillure massive et persistante d'un moût nous a été révélé par l'examen d'un réfrigérant de type Lawrence, appartenant à une maison exceptionnellement bien tenue et où cette source d'infection était très vraisemblablement la seule à incriminer. Il s'agissait d'un appareil à plis étroits et profonds, où ni le doigt, ni une brosse ordinaire ne pouvaient pénétrer. En introduisant au fond des chicanes une curette métallique stérile, nous avons ramené une sorte de croûte verdâtre que l'examen et l'ensemencement ont montré être constituée par une matière organique extrêmement riche en germes microbiens. Sa présence et sa teneur en germes étaient aisées à expliquer. Le réfrigérant subissait, entre chaque brassin, deux lavages, l'un assez superficiel, aussitôt après le passage d'un moût, l'autre, plus soigneux, avant le passage suivant. Le premier laissait sans aucun doute au fond des chicanes une couche plus ou moins épaisse de moût, c'est-à-dire d'un milieu sucré très propre à s'infecter. Ce milieu ne manquait pas d'être ensemencé de germes nombreux, car, tout près du réfrigérant, étaient les appareils de trituration du malt et d'épaisses poussières se déposaient sur les objets environnants.

Après avoir pullulé dans les dernières gouttes du moût, les bacilles étaient enrobés et fixés par la croûte tenace qui résultait de leur dessiccation et ils échappaient ainsi au deuxième lavage. Le moût du brassin suivant, capable encore, comme nous l'avons vérifié, de stériliser par sa haute température les plis les plus élevés de l'appareil, ne faisait plus, dans la moitié inférieure de celui-ci, que dissoudre peu à peu les couches superficielles de la croûte bacillifère et que se charger d'une façon continue d'un nombre considérable de germes. Nous pensons que cette description des faits, vérifiée par nous sur ce réfrigérant, peut seule rendre compte des souillures graves, régulières et persistantes, observées dans les moûts d'autres brasseries. Un nettoyage scrupuleux suivi d'une véritable stérilisation de l'appareil par lavages antiseptiques et passage d'un jet de vapeur a permis au réfrigérant envisagé plus haut de débiter un moût presque stérile et le premier brassin qui suivit

l'opération donna une bière excellente. Ces résultats se sont maintenus constants depuis lors.

Contrairement au bac dont les dangers ou les avantages varient avec les saisons ou les circonstances atmosphériques, le réfrigérant donne des résultats régulièrement bons ou mauvais suivant qu'il est bien ou mal entretenu.

*
* *

La présence du coli dans les levures est, ou plutôt était au début de notre enquête, une éventualité très fréquente. Au cours des trois premiers mois, nous l'avions constatée 12 fois sur 18 examens.

L'appréciation du degré de la souillure est malheureusement très délicate. L'étalement direct sur une boîte de Drigalski ou même de gélose lactosée est trompeur : au contact immédiat des cellules de levures le bacille se développe peu ou pas du tout. Il est donc nécessaire de diluer la levure dans une certaine quantité d'eau peptonée; et la numération du coli devient dès lors impossible puisque rien ne garantit la répartition homogène du bacille dans la levure, ni le taux exact de la dilution. On ne peut guère obtenir qu'une impression générale basée sur la comparaison de nombreux examens, et traduite, non par des chiffres, mais par des formules comme : souillure profonde, souillure médiocre ; pureté relative ou absolue. Cette dernière, prouvée par la culture négative en eau peptonée, d'une quantité importante de levure, a été observée à plusieurs reprises; mais le fait est assez exceptionnel quand il s'agit de levures en service depuis plusieurs brassins ; et certains négociants vendent comme levures pures des pieds de levain riches en colibacilles.

La présence de ce germe dans les levures n'a rien qui puisse nous étonner. Elle s'explique très aisément, dès que l'on connaît dans quelles conditions elles sont recueillies et conservées par la plupart des petits brasseurs flamands.

Il va de soi, tout d'abord, qu'en mélangeant une levure initialement pure avec un moût très riche en bactéries et particulièrement en colibacilles, le brasseur s'exposerait à ne recueillir, au cours de la fermentation, qu'une levure profondément souillée et l'impureté du moût, nous venons de le voir plus haut, est un

fait relativement fréquent. Mais la levure peut se charger encore de bactéries par d'autres voies. Dans la fermentation en tonneaux, couramment employée dans la région des Flandres, elle s'échappe par la bonde, coule sur les flancs du récipient et tombe finalement dans un baquet où elle est recueillie. Les brasseries sérieuses font fermenter leurs bières dans des tonneaux spéciaux, soigneusement étuvés à chaque brassin et dont les douves, au moins dans la région où passe la levure, ont été vernies ou passées à la poix de façon à obturer tous les pores du bois. Mais, dans beaucoup de petites brasseries, la fermentation se fait dans les fûts mêmes de livraison, c'est-à-dire dans des fûts nécessairement peu soignés, qui ont reçu durant leur transport toutes les poussières de la route, et ont roulé sur le sol des caves. Il faudrait un nettoyage singulièrement attentif pour les débarrasser de la terre et des matières organiques logées dans tous les pores du bois. Chez les brasseurs négligents, c'est la levure qui, descendant le long des douves, se chargera d'entraîner une partie des impuretés. Recueillie dans des baquets à découvert dans les caves, elle risquera encore d'être souillée, soit par suite de la propreté insuffisante du récipient, soit par le dépôt des poussières. Mais ce sont là des risques presque négligeables comparativement aux précédents.

CHAPITRE III

NATURE DES SOUILLURES QUI ATTEIGNENT LE MOUT

§ 1. — *L'eau.*

Si nous nous plaçons maintenant au point de vue, non plus de l'origine et du mécanisme des souillures, mais à celui de leur nature bactériologique, il n'y a plus à faire de distinction entre celles qui atteignent la levure et celles qui portent sur le moût. En fait, la levure ne se contamine guère que lorsqu'elle travaille au contact d'un moût impur. Dès lors, les sources d'infection à envisager se réduisent à celles qui peuvent atteindre le moût avant ou après son mélange avec la levure, au début de la fermentation. Ce sont essentiellement l'eau souillée et les poussières.

L'infection d'origine hydrique n'a guère d'importance que lorsque le moût peut se mélanger d'eau polluée, grâce aux fuites du réfrigérant. Encore cette eau, pour réaliser une souillure massive, malgré sa dilution dans une masse stérile, doit-elle être elle-même très sérieusement polluée.

C'est donc, dans ces cas, toute une flore assez banale et riche surtout en saprophytes, qui s'introduit dans le brassin, en même temps que le coli, si fréquent dans les eaux impures.

Peut-être quelques bactéries isolées par nous des bières, et en particulier, quelques espèces chromogènes, comme le *B. flavus non liquefaciens*, le *M. flavus desidens*, avaient-elles cette origine, mais il est pour ainsi dire impossible, devant l'inventaire bactériologique d'une goutte de bière, de déceler l'influence d'une pollution initiale par l'eau. Non seulement, en effet, beaucoup de bactéries de celle-ci se retrouvent communément dans les poussières; mais la plupart d'entre elles ne cultivent pas du tout en moût houblonné et tel est le cas, en particulier, des seules qui

pourraient être un peu caractéristiques, comme les vibrions et spirilles saprophytes, aisés à cultiver en milieu alcalin, mais non dans le milieu acide qu'ils trouvent dans la cuve guilloire. Une seule fois, la rencontre, sur une boîte ensemencée de 1 goutte de bière, de deux colonies de *cladothryx chromogenes* et d'une douzaine d'autres appartenant à une autre variété de cladothryx à fausses ramifications, nous a fait penser à l'intervention possible d'une souillure hydrique, les cladothryx étant très proches des algues inférieures et vivant habituellement dans l'eau.

§ 2. — *Les poussières.*

L'infection du moût tire donc son origine principale des poussières qui se déposent sur les bacs ou dans les plis des réfrigérants. La nature de la flore bactérienne de ces poussières ne peut donc manquer d'avoir sa répercussion sur celles du moût en fermentation et de la bière qui en provient. A ce point de vue, on peut envisager trois catégories de poussières, d'un intérêt bien inégal.

Tout d'abord, les poussières atmosphériques banales, que le vent soulève du sol desséché, des routes, des toitures, etc... De celles-là, il n'y a rien à dire de spécial. Les plus longs travaux consacrés à leur étude, ceux de Flügge, de Miquel, et de tant d'autres, n'ont certainement pas épuisé toute leur richesse en espèces microbiennes inconnues. Ce qu'on peut déduire de leur inévitable présence dans la fermentation du moût, c'est qu'elles introduisent vraisemblablement dans celle-ci bon nombre de germes qui jouent un rôle important dans la plupart des fermentations ou putréfactions spontanées.

Pour ne citer que deux exemples, rappelons seulement que le coli, dont nous avons constaté la présence presque constante au début au moins des fermentations en brasserie, est considéré comme participant très généralement à la putréfaction des viandes (1) et à la fermentation spontanée du lait (2).

(1) Tissier et Gasching. Recherches sur la putréfaction des viandes. *Annales de l'Institut Pasteur*, XVI, 1902, p. 865.

(2) Tissier et Gasching. Recherches sur la fermentation du lait. *Annales de l'Institut Pasteur*, XVII, 1903, p. 540.

Nous verrons d'autre part que l'entérocoque, ou tout au moins une espèce appartenant au même groupe, joue peut-être, dans l'acidification des moûts, un rôle tout à fait analogue à celui qui lui revient dans les premières phases de la coagulation spontanée du lait, sous cette réserve essentielle que, dans le premier cas, son action est limitée par celle d'un concurrent démesurément plus puissant et plus actif : la levure.

*
* *

Une autre catégorie de poussières, d'ordre moins banal, a depuis longtemps attiré l'attention des spécialistes. C'est celle que certains voisinages fâcheux risquent d'introduire dans les locaux et les appareils de brasserie. La proximité de moulins, d'écuries, de poulaillers, de pigeonniers, a été de tout temps considérée comme dangereuse, spécialement, il est vrai, au point de vue des « maladies de la bière ». Les brasseurs apportent même quelque précision dans leurs témoignages. C'est ainsi que le voisinage des pigeonniers risquerait de provoquer fréquemment la « tourne ». En réalité, la flore spéciale de la fiente des pigeons est à peu près inconnue, et cinq ou six espèces microbiennes au moins ont été accusées de faire « tourner » les bières, sans que le fait ait été jamais rigoureusement établi et sans que les espèces incriminées elles-mêmes aient été toujours rigoureusement définies. Mais, si l'on ne peut, même au point de vue purement industriel des « maladies de la bière », établir une relation constante de cause à effet entre telle infection du brassin et telle catégorie de poussières, on ne peut négliger entièrement une série de coïncidences frappantes, établies sur de multiples observations.

Sans même attendre que celles-ci aient reçu une confirmation scientifique, et qu'on se soit définitivement mis d'accord sur l'agent de chaque altération spéciale du moût, son habitat dans la nature, et ses voies d'introduction dans la brasserie, nous pouvons admettre comme probable que le voisinage de matières organiques spécialement riches en germe du groupe coli, comme les fumiers, les déchets épars sur le sol des poulaillers, etc., favorise un ensemencement spécialement abondant du moût par les microbes de ce groupe.

§ 3. — *La farine de malt.*

Mais il est une troisième catégorie de poussières qui devait attirer notre attention, parce qu'elle se rencontre pour ainsi dire fatalement dans toute brasserie, et ne se rencontre guère que là. Nous voulons parler des poussières de malt. Ces poussières sont extrêmement abondantes au voisinage des appareils où le grain est concassé en une sorte de farine grossière que recueillent des trémies. De véritables nuages de fines poussières s'échappent durant le broyage, et recouvrent toutes les surfaces accessibles du local, d'une couche souvent épaisse de plusieurs millimètres. Or, ces poussières sont très loin d'être stériles. A côté de bactéries banales, d'une fréquence très inégale suivant les échantillons choisis, on y rencontre d'une façon presque constante des germes qui semblent spécialement adaptés à ce milieu. A plusieurs reprises, en effet, nous avons examiné, soit du malt fraîchement concassé, soit des poussières déposées naturellement pendant le broyage, sur les appareils environnant le concasseur.

Ces résultats nous ont amené à reconnaître dans ces farines ou poussières une flore assez constante, à la seule condition d'employer les mêmes techniques d'examen dans tous les cas.

Laissant de côté toute une flore accessoire qui se rencontre surtout dans les poussières de malt transportées par l'air, et par suite mélangées de particules d'origines très diverses, flore constituée d'une foule de germes banaux, en particulier, cocci, sarcines, petits bacilles chromogènes, nombreuses bactéries sporulées aérobies (*subtilis*, *mesentericus*, etc.) ou anaérobies (*B. perfringens*, etc.), on peut dire que le malt renferme en grande abondance trois groupes de microbes, éminemment capables de pulluler dans ses macérations. Les uns se développent surtout à des températures relativement élevées, vers 40 degrés (bacilles lactiques); les autres à une température moyenne (bacilles du groupe *aérogenes*); avec ces derniers se multiplient plusieurs espèces de cocci que nous réunirons sous le nom d'entérocoques.

L'ensemencement en eau peptonée, en bouillon, en gélose profonde non sucrée, en gélatine, risque de faire méconnaître entiè-

rement l'abondance des bacilles du premier groupe ; les cocci et surtout les *B. aerogenes* pullulent en bouillon au point de masquer ou d'entraver le développement des lactiques vrais ; et d'autre part, ces derniers poussent pauvrement en gélatine. Le meilleur procédé pour mettre en évidence les espèces spécialement adaptées à la culture en malt, et pour les séparer entre elles, est de mélanger simplement l'orge concassée avec deux ou trois fois son poids d'eau et de la répartir en deux flacons ou séries de flacons. Une partie sera ensuite mise à l'étuve à 40 degrés ; l'autre, abandonnée à une température de 15 à 18 degrés.

La macération à froid s'acidifie plus lentement que celle placée à l'étuve. Il s'y développe une odeur agréable de pomme de reinette, tandis que l'autre, dès le deuxième jour, sent très nettement le lait aigri.

Enfin, une série d'ensemencements montre que les flores qui se sont développées sont très différentes.

Voici le résumé d'une de ces expériences :

50 grammes de malt concassé ont été mélangés à 200 centimètres cubes d'eau stérilisée. Le mélange a été examiné immédiatement sur lames. Il contenait, à côté des débris végétaux, très peu de germes. Sur une coloration par le Gram Nicole, on distinguait :

Quelques cellules de levure, d'assez nombreux cocci, quelques bâtonnets pour la plupart prenant le Gram ; de rares coccobacilles décolorés par l'alcool et rougis par la fuchsine ; des spores.

Une partie du mélange laissée à la température du laboratoire (16-18 degrés) évolue de la façon suivante :

ACIDITÉ en SO^4H^2 pour 1000.	EXAMEN DIRECT SUR COLORATION par le Gram-Nicole.	COLONIES OBTENUES par culture de 1 goutte sur gélose lactosée.
Après 24 h. 3,5	1° Grande majorité de bacilles coliformes : Gr. 0; certains plus allongés, même forme générale, également : Gr. 0. 2° Assez nombreux *cocci* ovalaires souvent en diplo et courtes chaînettes : Gr. +. 3° Rares bacilles rectilignes à bouts carrés, souvent réunis par deux, bout à bout : Gr. +.	1° Grande majorité de *B. aerogenes* (variétés 2, 1 et 3 de notre étude descriptive) et quelques espèces voisines : *B. hordeicola*, *proteus vulgaris*, *B. cloacae*. 2° Nombreux cocci du groupe entérocoque. 3° Deux colonies de *B. mesentericus fuscus*.
Après 48 h. 5	1° Nombreuses formes longues, irrégulières : Gr. 0; manifestement formes d'involution des *B. aerogenes*, rares formes colibacillaires : Gr. 0. 2° Très nombreux cocci ovalaires : Gr. +. 3° Assez nombreux bacilles rectilignes, longs et minces : Gr. +.	1° 12 colonies de *B. aerogenes* (variété n° 3). 2° Très nombreux entérocoques (plusieurs centaines). 3° Tardivement; nombreuses colonies d'un petit bacille voisin du *B. acidophilus*. Deux ou trois colonies de baçillles lactiques (surtout *B. lactis acidi*.
Après 72 h. 7	1° Plus de bacilles coliformes. 2° Entérocoques très nombreux. 3° Assez nombreux bacilles rectilignes, en chaînettes : Gr. +.	Presque exclusivement entérocoques. Quelques colonies du *B. filiformis*; lactiques vrais.

Cette formule se maintient ensuite jusque vers le septième

jour. A ce moment, des moisissures du genre mucor envahissent complètement le milieu.

L'autre partie du mélange est portée à l'étuve à 41°5.

ACIDITÉ en SO^4H^2 pour 1000.	ASPECT SUR COLORATION DIRECTE Gram-Nicole.	RÉSULTAT DE LA CULTURE de 1 goutte sur gélose lactosée.
Après 24 h. 4,7	Grosse majorité de bacilles rectilignes à bouts carrés : Gr. +. Quelques chaînettes d'un gros streptocoque à grains ovalaires, d'autres plus petites : Gr. +. Pas de formes colibacillaires.	Quelques cocci du type entérocoque en 24 heures. Plus tardivement; nombreuses colonies de bacilles lactiques. On a identifié : *B. lactis acidi*, *B. lactyl-lacticus*, *B. filiformis*.
Après 48 h. 9	Même aspect.	Rares entérocoques. Bacilles lactiques variés et nombreux.

Cette formule se maintient identique jusque vers le huitième jour, à ceci près que les derniers entérocoques ont disparu vers le sixième, et que les bacilles lactiques se font plus rares. Au dixième jour, on n'obtient plus de cultures sur gélose lactosée : une seule race de bacilles lactiques se développe en gélose Veillon.

Une telle expérience, qui ne fait d'ailleurs qu'appliquer un procédé classique d'obtention des ferments lactiques, ne peut évidemment tenir lieu d'un inventaire systématique des poussières du malt (1). Mais elle nous donne, au point de vue pratique, une orientation bien plus exacte que des cultures pratiquées sur des milieux artificiellement enrichis : bouillons, géloses, etc. ; et même, sur des milieux appropriés aux germes des brasseries : gélatines et géloses au moût et à la bière, par exemple.

Elle nous apprend, en effet, que si les brasseurs ont raison de redouter la pullulation des bacilles lactiques dans des circonstances où ils opèrent à des températures assez élevées; si, en particulier, ils ont intérêt à élever assez rapidement la chaleur

(1) En particulier, elle laisse de côté l'inventaire des espèces anaérobies.

du mélange de malt et d'eau, durant le brassage, de façon à atteindre la température favorable aux diastases (65-68 degrés), sans s'attarder trop à celle favorable aux ferments (40-50 degrés), les mêmes dangers ne se retrouvent plus durant la fermentation à 15-18 degrés. Si les germes signalés plus haut comme abondants dans le malt y étaient seuls présents, il faudrait s'attendre à voir, au moins durant les premiers jours, l'avantage rester à ceux qui préfèrent une température modérée, c'est-à-dire, avant tout, à ceux du groupe *aerogenes* et du groupe entérocoque.

En fait, cette flore en quelque sorte fondamentale du malt, dont nous venons d'indiquer les éléments, en nous en tenant d'ailleurs à la simple désignation de vastes groupes naturels, est très loin de représenter même une part prépondérante dans la masse considérable de microbes qui peuvent être introduits au début d'une fermentation.

Nous avons pu vérifier que, dans les brasseries très bien tenues, la flore dominante d'un brassin ne s'éloignait guère de celle que nous avons trouvée pour nos macérations de malt à froid, et que le coli, en particulier, y était très rare. Mais ce sont là des conditions presque exceptionnelles et, dans la généralité des cas, une foule considérable de bactéries de toutes origines vient s'ajouter aux groupes assez nettement définis qui pullulent dans le malt d'une façon pour ainsi dire normale; et presque tous les germes des poussières atmosphériques peuvent se donner rendez-vous dans la cuve guilloire, si tous ne sont pas aptes à pulluler en moût.

TROISIÈME PARTIE

ÉPURATION SPONTANÉE D'UN BRASSIN

CHAPITRE PREMIER

ÉLIMINATION DU « B. COLI » ET DU « B. AEROGENES » DANS CERTAINS BRASSINS

§ 1. — *Élimination du « B. coli ».*

Si nous considérons dans leur ensemble les multiples chances de contamination d'un brassin par des bactéries de diverses origines, ce n'est pas comme un accident que nous apparaîtra la souillure colibacillaire de la bière, mais comme l'éventualité la plus probable. Elle n'est cependant pas fatale. En fait, à côté des échantillons gravement souillés, nous en avons rencontré beaucoup entièrement exempts de coli. Ceci ne signifie nullement que ce germe n'ait jamais été introduit dans le moût en fermentation, mais que, s'il l'a été, il s'est du moins trouvé éliminé avant la livraison de la bière. Notre attention avait été attirée sur ce point par la comparaison de nos analyses de levures avec nos examens de bières. Nous avions constaté avec surprise que l'introduction dans une brasserie, d'un pied de levain pur, ne garantissait pas contre la production d'une bière riche en coli ; et que l'emploi d'une levure souillée n'empêchait pas toujours d'obtenir une boisson saine. La constatation des méfaits du réfrigérant levait la première difficulté. L'évolution de plusieurs brassins,

suivie par nous à l'aide de prélèvements quotidiens ou biquotidiens, nous apprit que le coli, ensemencé dans le moût au début de la fermentation, pouvait disparaître avant la fin de celle-ci.

Ces recherches ont été poursuivies dans trois brasseries différentes, avec le concours intelligent de leurs directeurs. Elles portent sur cinq brassins dont deux seulement ont abouti à la livraison de bières pures de coli.

Pour chaque échantillon prélevé, on faisait une série d'ensemencements, de quantités croissantes et connues; et on procédait, dans les cultures obtenues, à l'identification du coli suivant la méthode habituelle. Les chiffres de colibacilles du tableau ci-joint sont rapportés au litre: ceux des germes de toute espèce obtenus en ensemençant une goutte du liquide en gélatine, sont rapportés au centimètre cube. Lorsque aucun de nos tubes ne se troublait, la plus grande quantité ensemencée, N, était notée comme inférieure à la quantité minimum indispensable pour obtenir une culture de coli, ce que nous exprimions en disant que le nombre de coli par litre était $< \frac{1 \text{ litre}}{N}$. Par exemple, pour une série tout entière négative, et dont le plus grand volume ensemencé était 50 cm³, nous notons : chiffre de coli par litre < 20.

D'autre part, la notation > 30.000 signifie seulement que chaque goutte au trentième fournit *au moins* une culture de coli. Nous aurions pu tenter une numération plus exacte en apparence, en notant le nombre des colonies de coli développées à partir d'une goutte de liquide étalée directement sur Drigalski. Mais il eût fallu procéder à l'identification individuelle de chaque colonie, opération pratiquement impossible dans des cas où nous avons vu, par exemple, 150 colonies coliformes se développer à partir d'une seule goutte de liquide.

Quatre sur cinq de ces bières ont été clarifiées au quatrième jour; la troisième, au cinquième seulement. Cela tient à ce que le moût avait été ensemencé d'une levure pure sélectionnée, mais relativement trop peu abondante pour le moût à fermenter. La multiplication des cellules de levure s'est donc poursuivie bien plus longtemps qu'à l'ordinaire, et a retardé d'autant la fin de la fermentation.

La simple lecture de notre tableau met en évidence un certain nombre de faits intéressants. La levure était pure une seule fois; presque pure une autre fois; médiocrement souillée deux fois; très souillée une fois. Le moût au bas du réfrigérant s'est trouvé

		LEVURE	MOUT	MÉLANGE MOUT-LEVURE	12 heures.	24 heures.	36 heures.	48 heures.	60 heures.	72 heures.	84 heures.	96 heures.
1	Nombre de coli.	Nombreux.	$\geq$ 1.000 $\leq$ 3 000	$>$ 30.000	$>$ 30.000	$<$ 30.000	46.000	$\geq$ 3.000 $\leq$ 30.000	$\geq$ 3.000 $\leq$ 30.000	$\geq$ 3.000 $\leq$ 30.000	Clarifiée. 0	
	Nombre total des germes.	Très nombreux.	500	43.000	$>$ 83.000	91.000	.....	8.000	.....	420	500	
2	Nombre de coli.	Rares.	$>$ 3.000	.....	.....	$>$ 30.000	.....	$>$ 30.000	.....	.....	Clarifiée. $>$ 30.000	
	Nombre total des germes.	Nombreux.	4.200	.....	.....	8.000	.....	7.800	.....	.....	2.100	
3	Nombre de coli.	0	$>$ 3.000	.....	.....	$>$ 30.000	.....	$>$ 30.000	.....	.....	$>$ 30.000	Clarifiée. $>$ 30.000
	Nombre total des germes.	0	4.200	.....	.....	26.800	.....	7.000	.....	.....	6.600	7.800
4	Nombre de coli.	Rares.	$>$ 3.000	.....	.....	$>$ 30.000	.....	$>$ 30.000	.....	.....	Clarifiée. $>$ 15.000 $<$ 30.000	
	Nombre total des germes.	Nombreux.	2.600	.....	.....	Innombrables.	.....	13.000	.....	.....	1.200	
5	Nombre de coli.	Très rares.	$<$ 20	$<$ 100	$<$ 100	$<$ 100	$<$ 100	$<$ 100	$<$ 100	$<$ 100	Clarifiée. 0	
	Nombre total des germes.	Assez rares.	0	Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.	3.450	1.750	1.980	1.500	1.800	

riche en coli quatre fois sur cinq. Les combinaisons réalisées ainsi ont donc été très variées. Le brassin n° 5 seul a été pratiquement exempt de coli pendant presque toute son évolution. Il appartenait à la même brasserie où avaient, antérieurement, été suivis les brassins 3 et 4. Mais le nettoyage soigneux du réfrigérant avait modifié du tout au tout les conditions initiales de la fermentation. Grâce à cette opération systématiquement répétée depuis lors à chaque brassin, cette maison, qui avait toujours fourni des bières souillées, n'a jamais livré depuis que des produits irréprochables.

Le brassin n° 1 est l'exemple le plus frappant d'une infection initiale sérieuse aboutissant à la production d'une bière pure. Les trois autres, également contaminés au début (l'un d'eux, d'ailleurs, malgré l'emploi d'une levure pure), n'ont pu s'épurer de même; et, malgré une réduction notable du chiffre des colis, ils en contenaient encore beaucoup plus de 1.000 après clarification.

Nous aurons plus tard à revenir sur le commentaire de ce tableau. Pour le moment, nous pouvons déjà poser les conclusions suivantes :

La pollution des moûts au début de la fermentation est très facile à réaliser; elle est très fréquente; et, dans beaucoup de cas, elle aboutit à la production d'une bière souillée (exemple : brassins 2, 3, 4).

Même lorsqu'elle existe, le coli peut être éliminé avant l'achèvement complet de la bière (exemple : brassin 1).

Mais elle peut aussi être évitée, et le brassin entier être pratiquement exempt de coli (exemple : brassin 5).

Tous nos efforts, au point de vue pratique, doivent tendre à fixer les conditions permettant de réaliser ces deux dernières éventualités.

§ 2. — *Élimination du « B. aerogenes »*.

La fabrication strictement aseptique de la bière n'est guère possible qu'au laboratoire. Même l'approximation réalisée par le mélange d'un moût stérile avec une levure relativement pure, est une éventualité plutôt rare dans les brasseries flamandes. Dans la majorité d'entre elles, une foule de bactéries, dont une

bonne part suspectes, sont présentes en même temps que la levure au début de la fermentation. Et cependant, une partie seulement de ces brasseries livrent des bières suspectes. Nous avons saisi sur le fait, en suivant le brassin n° 1 de notre tableau, cette disparition en fin de fabrication, de colibacilles d'abord très nombreux. C'est sur ce point que doit maintenant se porter toute notre attention.

Nous nous proposons d'établir les faits suivants :

1° La disparition éventuelle du coli au cours de l'évolution d'un brassin n'est pas un fait isolé, sans analogie dans la destinée des autres *espèces* microbiennes ensemencées en même temps que lui dans le moût; mais chacune de celles-ci a, comme lui, son cycle propre et son échéance fatale;

2° Les cycles évolutifs d'espèces appartenant à un même *groupe* sont sensiblement parallèles et synchrones;

3° Le coli et les germes du même *groupe* sont, parmi les microbes présents au début d'un brassin, des premiers à avoir achevé leur évolution.

*
* *

Avant de se poser sous la forme générale que nous lui avons donnée, notre première proposition n'a tout d'abord été pour nous que le résumé d'une observation privilégiée. Dans une brasserie particulièrement bien tenue, en effet, nous avons eu la chance de pouvoir suivre un brassin dont la formule bactériologique initiale était à la fois simple et bien connue de nous. Le moût descendait stérile du réfrigérant, et, parmi les germes de la levure, deux espèces ou plutôt deux groupes d'espèces se montraient seuls capables de pulluler en eau peptonée phéniquée à 0,85 p. 1.000, dans l'étuve à 41°5 : c'étaient des bacilles du groupe du *B. lactis aerogenes* et des cocci du groupe entérocoque. Nous connaissons déjà la fréquence des uns et des autres dans les brasseries, pour avoir suivi leur développement dans des macérations de malt.

Dans le tableau suivant, A désignera l'*aerogenes*, B l'entérocoque, C sera le colibacille apparaissant de façon toute incidente au cours de cet examen. Les prélèvements ont été faits suivant une technique identique à celle employée pour la recherche du coli : prélèvements

biquotidiens et ensemencement en tubes d'eau peptonée de I goutte, II gouttes, V gouttes, X gouttes, 1 cm³, 2 cm³, 5 cm³ et 10 cm³ de moût. Des ensemencements ont été également faits en gélatine, mais les résultats des cultures en eau peptonée nous suffisent à suivre l'évolution des germes A, B, C.

Dans le tableau suivant O indique que le tube est resté stérile. S'il y a eu développement d'un seul germe, sa nature est indiquée par une majuscule; s'il y a eu développement parallèle de deux espèces, on emploie deux majuscules; si l'une est beaucoup moins abondante, on la dénote par un petit caractère, et de même dans le cas d'une culture pure, mais pauvre. Ces proportions étaient établies par le repiquage de l'eau peptonée sur une boîte de gélose de Drigalski-Comadi.

Germes de la levure : A et B très nombreux, C très rare. Moût stérile.

QUANTITÉ ensemencée en eau peptonée.	NOMBRE D'HEURES DE FERMENTATION EN FUTS AU MOMENT DU PRÉLÈVEMENT								
	12	24	36	48	60	72	84	96	110 Bière clarifiée.
I G	A	O	A	AB	A*c*	B	B	B	O
II G	O	O	A	A	AB	B	A*b*	B	O
V G	C	A	A	A	AB	B	B	B	O
X G	O	A*c*	A	A	AB	B*c*	AB	B	O
1 cm³	O	A	A	A	AB	B	B	B	*b*
2 cm³	O	A	A	*a*B	AB	B*a*	B	B	*b*
5 cm³	O	O	B	B	B	B	B	B	*o*
10 cm³	A	O	*a*	B	B	B	B	B	*o*

L'apparition du coli, que nous voyons signalé dans ce tableau comme ayant cultivé dans quelques tubes, tantôt isolément, tantôt en association, a un caractère si manifestement épisodique que nous sommes en droit de la négliger dans le cas

présent. Cette réserve faite, le tableau se lit avec la plus grande facilité. Nous y voyons un germe A, d'abord assez rare, pulluler rapidement. Un germe B, plus rare encore au début, puisqu'on ne le rencontre même pas lors du premier ensemencement, apparaît ensuite et semble se substituer au premier, pour disparaître presque complètement après clarification.

Deux anomalies peuvent cependant arrêter le lecteur. On comprend mal, à première vue, comment l'ensemencement de la vingt-quatrième heure et celui de la trente-sixième heure n'ont donné que des cultures de A nulles ou maigres pour des ensemencements massifs, alors que quelques gouttes fournissaient des cultures riches ; et comment, dans les ensemencements ultérieurs, A disparaît tout d'abord des tubes qui ont reçu le plus de moût.

La raison de ces faits est fort claire. Le résultat enregistré pour l'ensemencement de la vingt-quatrième heure correspond en réalité à quarante-huit heures de développement simultané des microbes et de la levure, dont vingt-quatre en fûts dans le moût et vingt-quatre à l'étuve, dans un mélange de moût et d'eau peptonée. Si nous supposons, comme il est infiniment probable, que l'élimination de A est opérée par le développement même de ses concurrents, levures et germes B, cette élimination se poursuivra dans l'étuve comme elle se poursuit en fûts, et elle sera d'autant plus active que le moût aura été moins dilué d'eau peptonée.

Le tube le plus richement ensemencé doit donc manifester, le premier, l'action d'arrêt exercée sur le germe le moins résistant par les germes les plus actifs ; et nous avons en effet constaté que la levure s'était vigoureusement développée, surtout dans ces tubes. La même raison explique que, dans la bière achevée, les ensemencements de 1 et 2 centimètres cubes avaient été les seuls à fournir des cultures. Selon toute vraisemblance, les tubes ensemencés de 5 et 10 centimètres cubes ont reçu 5 ou 10 fois plus de germes vivants que les précédents, mais une dilution insuffisante d'eau peptonée n'a pu modifier l'action empêchante du milieu sur ces germes.

Si l'on tient compte de ces remarques, l'évaluation du chiffre minimum des germes existant dans le moût doit prendre pour base l'ensemencement minimum nécessaire pour obtenir une

culture, *dans les tubes où la dilution était suffisante*, et le tableau précédent fournit les chiffres suivants, rapportés au litre (1).

	12 h.	24 h.	36 h.	48 h.	60 h.	72 h.	84 h.	98 h.	110 après clarification.
A.	≥ 100 < 200	≥ 6.000 < 15.000	> 30.000	> 30.000	> 30.000	> 1.000	> 5.000	0	0
B.	< 100	> 100	> 30.000	≤ 500 > 200	> 15.000 < 30.000	> 30.000	> 30.000	> 30.000	≥ 1.000 < 6.000

La substitution du germe B au germe A et l'ébauche de son élimination deviennent ainsi manifestes. Il y a donc eu, au minimum, concurremment avec la fermentation levurienne, deux cycles de fermentations microbiennes, non synchrones, mais chevauchant l'un sur l'autre ; l'un, achevé ; l'autre, presque à son terme, aú moment où la bière était prête à être livrée.

(1) Le chiffre, fourni pour A à la douzième heure, a été confirmé par d'autres ensemencements dont nous n'avons pu tenir compte dans le tableau.

CHAPITRE II

GÉNÉRALISATION : DÉFINITION ET DÉMONSTRATION DES FLORES DOMINANTES

§ 1. — *L'inventaire bactériologique des bières.*

L'élimination du coli au cours de la fermentation d'un moût n'est donc pas un fait unique, puisque nous avons sous les yeux l'exemple frappant du cycle décrit par un germe d'une autre espèce. Il nous reste à montrer qu'il est général.

Le fait qu'une bière achevée contient des espèces microbiennes beaucoup moins nombreuses que celles présentes en cuve guilloire, prouve seulement que le moût a été un mauvais milieu de culture; peut-être un milieu toxique, pour beaucoup d'entre elles. Certaines ont pu périr dès leur ensemencement. On ne saurait, pour celles-là, parler de cycle évolutif. D'autres, manifestement, survivent à la clarification, et tel est le cas, assez souvent, pour le colibacille lui-même. Y a-t-il donc des espèces qui survivent indéfiniment, et la disparition même de celles qui s'éliminent, est-elle régie par un hasard aveugle, qui aurait pu les épargner alors qu'il les condamne?

Il n'y a pas de hasard dans le cycle évolutif de ces germes. Sauf au début, où la nature et les proportions numériques des races représentées dans la cuve guilloire sont, en effet, presque quelconques, la formule bactérienne d'une bière est le plus souvent telle, que le groupement des espèces dominantes exclut l'hypothèse du hasard. Établissons d'abord, en fait, l'existence d'espèces dominantes et leur groupement.

Si nous faisons l'analyse bactériologique d'une bière, de fabrication plus ou moins récente, nous trouvons presque tou-

jours que seules quelques espèces y sont très abondantes ; et qu'il y a une grosse disproportion entre cette abondance et la rareté des autres bactéries également présentes; ou même, que ces espèces semblent exister presque seules. Nous les nommerons : *espèces dominantes.*

Nous définirons la *flore dominante* d'une bière donnée, par la détermination et la numération des bactéries que renferme une très petite quantité de l'échantillon considéré. Pour permettre la comparaison des résultats, nous donnerons toujours les chiffres correspondant à 1 goutte (1 c.c./30), même quand l'examen aura nécessité l'emploi de quantités plus élevées.

La technique employée a été la suivante :

1 goutte, II gouttes ou V gouttes étaient ensemencées :

1° En gélose de Veillon bouillante.

2° En gélose de Veillon fondue, ramenée à 37 degrés, et refroidie après ensemencement.

3° En gélatine fondue et coulée en boîte de Petri.

4° Par étalement sur boîte de Drigalski.

5° En gélose lactosée tournesolée.

Le premier ensemencement avait pour but la recherche des spores : spécialement celles de bactéries anaérobies. De même, les anaérobies stricts auraient pu être obtenus dans la gélose de Veillon ensemencée à 37 degrés. En réalité, ces deux techniques se sont montrées de faible intérêt. Nous n'avons isolé qu'une seule fois le *B. perfringens* d'une seule goutte de bière, et la colonie pouvait aussi bien provenir d'une spore égarée dans la bière que d'une forme végétative, car elle s'était développée dans un tube ensemencé à 37 degrés. Le moût des brasseurs est un milieu beaucoup trop oxygéné pour que les anaérobies puissent y vivre aisément, et, à la suite d'une série de recherches négatives, nous n'avons pas insisté sur la poursuite des anaérobies stricts. S'il en existe normalement dans la bière, ce ne peut jamais être en quantités suffisantes pour qu'on en doive tenir compte dans l'étude des flores dominantes et c'est à ce seul point de vue que nous nous plaçons.

La gélatine est un mauvais milieu pour la culture de beaucoup de microbes fragiles et exigeants qui abondent dans la bière. En particulier, tous ceux du groupe du *B. exilis* et du *B. acidophilus* cultivent à peine en gélatine à l'étuve, et beaucoup de lactiques poussent misérablement sur plaques à 16 ou 18 degrés. Beaucoup d'entérocoques sont dans le même cas. L'utilité de la gélatine réside surtout dans le diagnostic rapide d'espèces bien connues.

L'ensemencement sur gélose de Drigalski-Conradi n'a été employé par nous que pour la différenciation aisée du colibacille.

La technique de choix est l'étalement d'une goutte sur une plaque de gélose lactosée tournesolée. Mais il faut avoir soin de la laisser plusieurs jours à l'étuve. Le premier jour, on y voit surtout les bactéries des groupes *coli*, *aerogenes*, *subtilis*, *mesentericus*; le deuxième jour, les cocci, les sarcines, les levures sauvages; certaines espèces peu vigoureuses sur milieux solides demandent plus longtemps encore : tels sont les lactiques et acétolactiques. Plusieurs des germes rapprochés par nous du *B. exilis* et du *B. filiformis* n'ont donné de très fines colonies qu'en cinq ou six jours.

Nous avons également employé des milieux plus appropriés à certaines espèces, tels que la gélose au moût; et des milieux liquides comme le lait et surtout le petit-lait; mais ici la numération exacte devenait impossible et nous devions nous contenter de dire que, par exemple, 1 goutte contenait, *au moins*, un *B. acidophilus* ou un bacille lactique.

Nous avons ainsi caractérisé un très grand nombre d'espèces. Les unes ne se sont montrées que d'une façon tout à fait exceptionnelle; nous ne les signalerons même pas dans l'énumération suivante. Celle-ci ne comprend que des germes isolés dans plusieurs échantillons ou tout au moins dont les colonies, dans une bière déterminée, étaient assez nombreuses pour forcer l'attention. Nous avons donc rencontré :

1° Des bactéries du groupe coli : *B. coli commune* et *B. coli communior*, quelques *para-coli**.

2° Des bactéries du groupe du *B. lactis aerogenes*, se distinguant surtout des précédentes par l'absence de production d'indol en milieu peptoné : le *B. aerogenes typique* et plusieurs *variétés** de ce genre, dont quelques-unes entièrement nouvelles; un bacille très fréquent, très nettement caractérisé, se rapprochant du *B. aerogenes* par ses caractères culturaux, et des bacilles paratyphiques par son défaut d'action fermentative sur le lactose : nous l'avons nommé *B. hordeicola**.

Tous les microbes précédents se comportent en moût, comme nous le verrons, d'une façon sensiblement analogue : nous les désignerons globalement sous le nom de groupe *coli-aerogenes*. Nous ne faisons pas rentrer dans ce groupe un bacille morphologiquement très analogue aux précédents, mais tout différent par ses actions chimiques : le *B. fæcalis alcaligenes*. Celui-ci n'attaque nullement les sucres, et ne fait fermenter que les produits de désintégration assez avancée des albumines.

3° Des bacilles chromogènes : *B. ochraceus**, *B. subflavus*, *B. aureus*.

4° Des bacilles lactiques* et acéto-lactiques, ces derniers analogues aux *B. exilis* et *acidophilus*.

5° De nombreux bacilles sporogènes appartenant au groupe aérobie strict du *B. subtilis* et au groupe anaérobie facultatif du *B. mesentericus*. Certains devront être considérés comme de simples variétés de ceux-ci; d'autres se rattacheront à des espèces distinctes : *B. implexus*, *B. mycoides*, etc. C'est tout ce groupe que nous désignerons sous le nom de groupe *subtilis-mesentericus*.

6° Des cocci non chromogènes : plusieurs variétés d'entérocoques, *M. pyogenes albus*, *M. candidus*, *M. griseus*, *M. cremoides*.

7° Des cocci chromogènes : *M. luteus*, *M. pyogenes citreus*; *M. flavus tardigradus*.

8° De très nombreuses sarcines : *S. luteola*, *S. pulchra**, *S. flava**, *S. alba*, *S. meliflava*, *S. aurantiaca*, *S. carnea*, *S. cerevisiae*.

Beaucoup de nos échantillons répondaient exactement aux descriptions classiques. Nous nous contenterons, pour ces espèces, de renvoyer le lecteur aux traités et ouvrages spéciaux, et nous ne donnerons sur elles, à la fin de ce travail, que les indications qui nous semblent utiles pour faire comprendre leur rôle possible et la signification de leur présence dans un brassin. Les espèces marquées d'une astérisque feront l'objet, soit d'une description complète, si elles sont entièrement nouvelles, soit d'une note les comparant aux types classiques, si elles ne représentent qu'une variété de ceux-ci, ou si ces types eux-mêmes sont mal définis.

§ 2. — *Flores dominantes.*

Chaque échantillon de bière examiné ne contenait, naturellement, qu'un petit nombre de ces espèces par goutte. Mais les flores rencontrées étaient très différentes, aussi bien au point de vue du chiffre global des germes, qu'à celui du nombre des espèces représentées et à la nature de celles-ci. La comparaison des résultats d'une cinquantaine d'inventaires complets nous conduit à des remarques intéressantes.

Un premier fait est la constatation, dans la majorité des échantillons, d'une prépondérance numérique très marquée d'une espèce donnée : espèce dominante.

Parfois, la flore se simplifie à l'extrême, comme dans les exemples suivants, tirés de bières non colifères :

Bière à prédominance de sarcines (Bière M, 12 septembre 1915) :
I goutte : 110 *sarcina pulchra*; 2 entérocoques; 1 *mesentericus vulgaris*.

Bière à prédominance de bacilles sporogènes (Bière H, 27 décembre 1915) :
I goutte : 85 *B. mesentericus fuscus*; 1 *B. mycoides*.

Dans ces deux cas, l'expression : espèce dominante, trouve son application la plus tricte. Dans d'autres échantillons, la variété des espèces isolées est bien plus considérable, et il n'y a pas nécessairement un avantage numérique écrasant en faveur de l'une d'elles, mais tous semblent au moins appartenir au même *groupe*.

Bière avec prédominance de bactéries du groupe *coli-aerogenes* (Bière C, 24 décembre 1915).
120 coli; 60 *B. aerogenes*; 20 *B. ochraceus*; 11 *B. hordeicola*.

Dans d'autres cas, enfin, la variété est encore plus grande. Les espèces sont nombreuses et appartiennent à des *groupes divers*. En voici un exemple : Bière M, 24 décembre 1915.

I goutte : 50 *B. mesentericus vulgaris*; 6 *B. mesentericus ruber*; 4 *B. subtilis*; 2 *B. mycoides*; 2 *sarcina carnea*; 10 *sarcina meliflava*; 4 *M. luteus*; 6 *M. pyogenes albus*; 8 *M. flavus tardigradus*; 2 *M. griseus*.

Il peut sembler à première vue que la constatation, dans une seule goutte de bière, d'espèces à la fois aussi nombreuses et aussi richement représentées, aille directement à l'encontre de notre conception des flores dominantes. Bien au contraire, elle la confirme pleinement. N'est-il pas frappant, en effet, de voir que, sur près de cent colonies issues d'une seule goutte, aucune n'appartienne à un germe du groupe *coli-aerogenes*, si riche pourtant en espèces vivaces? Est-il vraisemblable qu'aucune bactérie appartenant à ce groupe n'ait été ensemencée dans le moût initial, où nous savons qu'en particulier le coli et le *B. aerogenes* pullulent d'ordinaire?

L'explication la plus simple est évidemment celle-ci : les espèces présentes au début d'un brassin, et capables de pulluler dans le moût, évoluent chacune pour son compte. Les unes pullulent de suite et disparaissent vite; les autres se multiplient tardivement et survivent plus longtemps, comme nous avons vu se comporter, dans le brassin étudié plus haut, le *B. lactis aerogenes* et l'entérocoque.

Cet exemple privilégié éclaire la signification des formules de flores dominantes. Il rend compte de cette simplification de la formule bactériologique qui, peu de jours après l'ensemencement en moût d'une foule très variée de microbes, se traduit par la prédominance presque exclusive d'un très petit nombre d'espèces. Il nous montre, de plus, que la formule par laquelle; aussitôt après la clarification, nous essayons de caractériser une flore dominante, n'exprime nullement une proportion stable et définie des espèces, mais un équilibre momentané, en relation plus ou moins directe avec la composition chimique du milieu. Si nous avions suivi notre brassin, non pas seulement jusqu'au moment où la bière est livrée au consommateur, mais jusqu'à celui où son alcool lui-même est détruit, nous aurions vu la flore dominante changer de formule et les ferments acétiques, les mycodermes ou d'autres espèces en former l'immense majorité.

Sans doute aussi, dans quelques cas, aurions-nous vu pulluler les ferments des corps azotés, et ces derniers se transformer sous leur action en produits filants, visqueux et amers.

Les formules que nous établissons en général très peu de temps après la clarification, représentent donc une simple coupe transversale, où la courbe évolutive propre de chaque espèce n'est représentée que par un point. L'espèce dominante à ce moment peut n'être pas celle qui, dans l'évolution totale de la bière, aurait manifesté la plus grande activité; c'est bien plutôt celle qui se trouvait, au moment de l'examen, au sommet de sa courbe évolutive. D'autres auparavant ont pullulé et ont disparu avant de pouvoir être signalées par l'analyse; d'autres aussi, qui ne sont encore représentées que par de rares individus, et ne se trouvent pas mentionnées dans l'inventaire d'une goutte unique, se multiplieront les jours suivants. Notre formule des flores dominantes est donc en quelque manière arbitraire au point de vue biologique de la collaboration des espèces à une œuvre

commune de fermentation; mais, au point de vue médical et pratique, elle donne une approximation du contenu microbien d'une boisson, au moment précis où celle-ci doit être consommée, et c'est uniquement ce point de vue qui nous intéresse pour le moment.

CHAPITRE III

ÉVOLUTION PARALLÈLE DES ESPÈCES SE RATTACHANT A UN MÊME GROUPE

Il nous serait sans doute plus aisé de fixer les conditions de la survie du colibacille dans la bière, si nous pouvions comparer son cycle évolutif avec celui d'autres bactéries. En particulier, nous devons vérifier si sa résistance dans le moût en fermentation est ou non analogue à celle des germes très nombreux composant avec lui le groupe désigné par nous sous le nom de groupe *coli-aerogenes*.

L'évolution parallèle de ces germes est déjà rendue très vraisemblable par l'étude des flores dominantes. Il nous est arrivé de voir une seule goutte de bière fournir par étalement sur gélose lactosée plusieurs centaines de colonies de coli, et de très rares colonies d'un autre germe. Mais c'est là l'exception absolue. Beaucoup plus souvent, si on pratique l'identification de ces colonies, on trouve une certaine proportion d'autres bactéries; mais, dans l'immense majorité des cas, il s'agit de paracoli, de *B. aerogenes* ou de variétés très proches de ce germe, de *B. hordeicola*, toutes bactéries appartenant au groupe *coli-aerogenes* (1).

Inversement, là où ces bactéries étaient abondantes, nous étions presque certains de trouver du coli.

Un autre argument nous est fourni par les ensemencements de bacille d'Éberth et de paratyphiques pratiqués en divers échantillons de bière. Ces germes pathogènes meurent et survivent là où meurt et survit le coli; et les mêmes influences qui,

(1) Nous avons constamment vu le *B. ochraceus*, quoique liquéfiant la gélatine et, par suite, exclu du groupe coli, suivre la destinée de celui-ci.

sans détruire ce dernier, s'opposent à sa multiplication, agissent de même sur les premiers. C'est même cette particularité qui nous a permis de réaliser une expérience très difficile à mener à bien dans un milieu qui ne se fût pas comporté de même vis-à-vis des deux catégories de germes. Il s'agissait de rechercher si le bacille d'Eberth pouvait survivre dans une bière riche en coli. Nous avons pu, après un large ensemencement, le retrouver très facilement par une série de repiquages échelonnés, par exemple, de deux en deux jours. La proportion de coli et d'Eberth cultivant par ensemencement d'une seule goutte s'est maintenue sensiblement constante durant toute la durée de l'expérience, ce qui montre bien qu'aucun des deux germes ne pullulait tandis que l'autre serait resté inactif.

Nous pouvons donc admettre comme probable que, dans l'ensemble, les bactéries du groupe coli évoluent dans un brassin d'une façon à peu près parallèle. Sans doute, la formule n'est pas rigoureusement exacte dans le détail : toutes ces bactéries n'ont exactement, ni les mêmes besoins, ni la même tolérance à l'égard de l'acidité du milieu, ni la même résistance à ses actions antiseptiques; toutes ne se multiplient pas dans les mêmes proportions et ne s'éliminent pas à la même heure. Mais ces différences sont minimes, comparées à celles qui existent entre l'évolution de ces bactéries et celle de microbes d'autres groupes : sporogènes, sarcines, etc. Nous trouverons une nouvelle confirmation de ce fait dans les expériences suivantes, qui nous ont permis d'apprécier, en quelque manière, le début probable de l'évolution de ces espèces en moût.

L'ÉVOLUTION DU GROUPE « COLI-AEROGENES »

§ 1. — *Pullulation précoce du groupe « coli-aerogenes ».*

Lorsque nous avions pratiqué en bouillon l'ensemencement de poussières de malt extrêmement riches en germes de toutes espèces, nous avions déjà remarqué qu'en bouillon et à l'étuve, les germes du groupe *coli-aerogenes* étaient ceux dont la pullulation était de beaucoup la plus précoce et la plus vigoureuse. Dès

les cinq ou six premières heures, ils étaient presque à l'état de pureté dans le liquide déjà un peu louche, et quelques *B. subtilis* seuls, près de la surface, annonçaient l'apparition d'autres espèces.

Cette remarquable vitalité du coli, fréquemment utilisée quand il s'agit d'isoler ce bacille d'une eau suspecte, était partagée en fait par bon nombre de germes voisins, *B. aerogenes*, *B. hordeicola*, etc. Devait-elle se manifester aussi nettement dans les ensemencements en moût houblonné, à la température des caves? Nous sommes en mesure de répondre par l'affirmative.

Des innombrables germes ensemencés avec la levure dans la pratique courante de la brasserie flamande, ceux du groupe *coli-aerogenes* sont les premiers à pulluler dans le moût. Nous avons contrôlé le fait à plusieurs reprises. Il n'apparaît pas avec évidence dans le tableau où nous avons représenté plus haut l'évolution du coli au cours de plusieurs brassins : dans le brassin n° 1 le mélange moût-levure donnait déjà une culture de coli pour chaque goutte et, ni pour ce prélèvement, ni pour les suivants, il n'a été ensemencé de quantités inférieures; d'autre part, dans les brassins 2, 3 et 4, la numération n'a pas été faite dans ce mélange. Toutefois, dans le brassin n° 3, où le moût n'a été ensemencé que de levure pure, on peut sans inconvénient prendre comme base le chiffre établi pour le moût seul, chiffre compris entre 3.000 et 6.000 par litre. Ici, la pullulation est déjà manifeste, puisque, au bout de vingt-quatre heures, le chiffre minimum passait à 30.000. Or, ce dernier chiffre ne donne qu'une faible idée de la multiplication très active qui doit avoir lieu au début du brassin.

Au laboratoire, en effet, nous avons ensemencé en même temps, en moût houblonné, à une température qui ne dépassait pas 16 degrés, une série de germes, pour la plupart isolés de bières, et choisis parmi les plus fréquents. Voici les résultats de cette comparaison. Ont donné en vingt-quatre heures :

Trouble intense.	*B. lactis aerogenes* (isolé de la bière et mobile).
	B. hordeicola.
	B. aerogenes (variété n° 3, 1er échantillon).
Trouble très net.	*Colibacille* (isolé de matières fécales).
	B. lactis aerogenes (souche de l'Institut Pasteur).
	B. ochraceus.

Trouble très net.	*B. aerogenes* (variété n° 3, 2e échantillon).
	B. subtilis.
Trouble léger . . .	*B. mesentericus ruber.*
	B. mesentericus (fuscus).
	Entérocoque.
	B. aerophilus.
	Sarcina flava.
Pas de trouble, ondes moirées.	*B. subflavus.*
Culture nulle. . .	*B. fæcalis alcaligenes.*
	B. acidiparalactici.

Le coli et, en général, les germes du groupe *coli-aerogenes* se montrent donc des plus favorisés parmi les microbes ensemencés au début d'un brassin, et des premiers à se multiplier.

§ 2. — *Disparition du groupe « coli-aerogenes ».*

Il est beaucoup plus malaisé de dire à quel moment et sous quelles influences le coli et les germes du même groupe disparaissent. Nous avons admis que cette élimination devrait être effectuée au moment de la livraison, c'est-à-dire, pratiquement, immédiatement après la clarification. Mais c'est là une exigence et non une constatation. En fait, beaucoup de bières, presque la majorité, conservent leurs colibacilles bien au delà de cette date. Ce que nous pouvons dire, en nous basant sur la résistance, non seulement du coli, mais du *B. aerogenes*, dans les brassins que nous avons suivis, c'est que, chaque fois que ces germes étaient présents en abondance au début de la fermentation, leur élimination a demandé *au minimum* trois jours, c'est-à-dire toute la durée de la fermentation principale. Si donc nous admettons que la presque totalité des brassins mis en fermentation dans la région des Flandres, contiennent au début, sinon du colibacille, au moins du *B. aerogenes*, une très forte proportion s'en trouve débarrassée au quatrième ou au cinquième jour, tandis qu'un nombre à peu près égal en reste souillé pendant plusieurs semaines.

* * *

Le moment de l'élimination du groupe *coli-aerogenes* est donc impossible à préciser au point de vue purement chronologique.

Serait-il au moins possible de le localiser par rapport à l'évolution des espèces microbiennes concurrentes ?

Nous savons que l'introduction des bactéries dans un brassin ne peut guère se faire que tout au début de celui-ci, si bien que tous ceux que nous retrouvons dans une bière étaient sans doute présents dans la cuve guilloire. Nous savons, d'autre part, que, si le coli peut être très rare dans le mélange moût-levure, le *B. aerogenes* et le *B. hordeicola*, hôtes habituels des poussières de malt, y sont presque fatalement en quantités considérables. On peut donc presque affirmer que des bactéries qui existent encore dans une bière exempte à la fois de coli et d'*aerogenes* ont, en réalité, survécu à ceux-ci ou, tout au moins, à ce dernier. Or, des nombreuses espèces isolées au cours de nos recherches, il en est bien peu dont nous n'ayons pu trouver des spécimens vivants dans une telle bière ; et les seules que nous n'ayons jamais rencontrées dans ces conditions, sont précisément des germes assez voisins du groupe *coli-aerogenes* par beaucoup de leurs caractères (*B. ochraceus*... *Ascobacterium lutescens*).

Nous devons donc considérer comme susceptibles de survivre aux bactéries du groupe *coli-aerogenes*, presque toutes les sarcines, un grand nombre de cocci, et, en particulier, ceux du groupe entérocoque ; tous les bacilles lactiques et les bacilles acéto-lactiques voisins du *B. exilis* et du *B. acidophilus* ; bon nombre de petits bacilles chromogènes, et surtout les très nombreux bacilles ferments des corps azotés, et appartenant pour la plupart au groupe *subtilis-mesentericus*.

Il y a donc une sérieuse présomption que, de toutes les espèces ensemencées au début d'un brassin, celles du groupe *coli-aerogenes* soient parmi les moins résistantes. Nous entendons par là les comparer uniquement aux espèces susceptibles d'être retrouvées dans la bière, et même en assez grande abondance pour être retrouvées dans une seule goutte ; non à une foule de germes fragiles ou mal adaptés qui, sitôt introduits en cuve guilloire, cessent de se développer ou même périssent. Nous apprécions donc la précocité de la disparition du groupe *coli-aerogenes* par rapport aux espèces capables d'être mises en évidence par culture d'une goutte de bière, c'est-à-dire d'entrer dans la formule d'une flore dominante.

En comparant les résultats que nous fournissent les inventaires

bactériologiques de plus de soixante échantillons, inventaires où le nombre des colonies est toujours rapporté à une goutte, nous avons été frappé des trois faits suivants :

1° Lorsque le coli on les germes du même groupe sont très nombreux (de 50 à plusieurs centaines par goutte), aucun germe appartenant à d'autres groupes ne coexiste d'ordinaire avec eux.

2° Au contraire, lorsqu'ils sont plus rares, d'autres espèces apparaissent sur les plaques, et, parmi celles-ci, certaines s'associent volontiers en nombre considérable à des proportions encore élevées de coli (de 10 à 50): ce sont surtout des cocci, des levures sauvages, des moisissures; d'autres ne se rencontrent guère en abondance que si le coli est rare (de 1 à 10) : ce sont, le plus souvent, des bacilles du groupe *mesentericus-subtilis*.

3° Dans les bières ne contenant plus de bacilles du groupe *coli-aerogenes*, ce sont surtout ces sporogènes qui se rencontrent, tantôt purs, tantôt associés aux cocci et aux sarcines. Dans un type de bière beaucoup plus rare, dominent, avec les entérocoques, des ferments lactiques ou acéto-lactiques.

*
* *

Pouvons-nous considérer cette série d'inventaires ordonnés suivant les chiffres décroissants du coli, comme correspondant à des phases successives de son élimination dans un brassin déterminé?

Une série de recherches nous permet d'établir directement ce qui n'était encore qu'une simple induction. En fait, nos examens quotidiens ou biquotidiens nous ont déjà montré le coli se raréfiant ou disparaissant totalement au quatrième jour de la fermentation, dans deux des brassins étudiés plus haut. Nous avons montré également, dans un autre tableau, le *B. aerogenes* d'un autre brassin faisant place à l'entérocoque. Mais nous avons pu aller plus loin. Dans la brasserie où nous avons fait une partie de nos recherches, le directeur nous pria un jour de suivre un brassin où, volontairement, il introduisait, dans le but de l'enrichir en bacilles lactiques, une macération de malt à froid. Cette macération avait été livrée à la fermentation spontanée des germes du malt durant un temps, à notre avis, trop court,

puisque c'est au bout de deux jours et demi seulement après sa préparation qu'elle fut versée en cuve guilloire. Son acidité, à ce moment, ne dépassait pas 2,1 et une énorme quantité de *B. aerogenes* y était encore vivants. Ce furent donc 3 hectolitres d'une véritable culture d'*aerogenes*, au milieu desquels existaient même quelques coli, qui furent ajoutés à un brassin de 80 hectolitres. L'élimination se fit cependant de façon parfaite, comme on le verra par le tableau suivant. Les chiffres, comme toujours, sont rapportés à une goutte (1).

Macération à froid (18°) 24 heures. Acidité, 1,6	580 germes du groupe *aerogenes* dont : 7/10 *aerogenes* mobile. 2/10 *aerogenes* immobile. 1/10 *B. hordeicola.*
	40 *proteus vulgaris.*
	15 à 20 coli.
	50 *B. ochraceus.*
	40 à 50 *ascobacterium lutescens.*
	Innombrables cocci.
Macération à froid 48 heures. Acidité, 2,1	400 groupe *aerogenes.*
	10 *proteus vulgaris.*
	0 coli.
	60 *B. ochraceus.*
	50 *ascobacterium lutescens.*
Mélange, moût, macération et levure en cuve guilloire. Acidité 1,1	110 groupe *aerogenes.*
	0 coli.
Moût après 24 heures de fermentation.	70 groupe *aerogenes.*
	Nombreuses levures.
Après 48 heures.	20 groupe *aerogenes.*
	4 *M. yriseus.*
	2 *sarcina aurantiaca.*
	2 *penicillum nigrum.*

(1) Ils ne concernent que les aérobies et les anaérobies facultatifs, les seuls que nous retrouvons d'ordinaire dans les formules de flores dominantes ; en réalité, si les anaérobies ne passent qu'en petit nombre dans la bière, nous avons de sérieuses raisons de croire qu'ils jouent un rôle important dans les fermentations spontanées du malt, et nous espérons pouvoir le montrer dans d'autres travaux.

Après 72 heures.	60 *B. implexus.* nappe continue de *sarcina candida.* 10 *sarcina aurantiaca.* 2 *B. albus non liquefaciens.*
Bière clarifiée.	7 *B. implexus.* Nombreuses levures.

Nous avons ici la preuve directe de l'élimination, au cours d'un brassin, des bactéries du groupe *coli-aerogenes*, et de certaines autres espèces (*B. ochraceus*, *ascobacterium luteseens*) qui semblent partager sa destinée. La bière achevée de cette brasserie étant toujours aussi pauvre en germes et fournissant toujours, à l'inventaire bactériologique, une formule analogue, l'élimination de tout ce groupe doit y être considérée comme régulière. Et il s'agit bien d'une élimination complète, puisque l'ensemencement, non plus de 1 goutte sur gélose lactose, mais de plusieurs centimètres cubes en eau peptonée, ne donne plus de cultures d'*aerogenes*. Notons en passant que cette élimination débute sans doute dès l'introduction en cuve guilloire ; nous ne trouvons pas ici la pullulation très passagère observée dans d'autres brassins. La multiplication des cocci, puis leur disparition, ont par contre été d'une netteté saisissante. D'autre part, une série d'ensemencements dans un petit-lait acide à un taux de 3,5 nous ont montré que les bacilles lactiques vrais, jamais assez abondants pour être retrouvés dans une seule goutte, ont toujours fourni des cultures pour X gouttes ensemencées. Ils semblent donc avoir simplement survécu sans se multiplier. Quant au *B. implexus*, proche parent du *mesentericus*, il a pullulé tard, mais a seul survécu assez nombreux pour être reconnu comme espèce dominante.

Il ne faut pas sans doute prendre ces chiffres comme des données absolues. Une goutte prise au hasard n'est pas identique à une autre ; surtout, il faut éviter de conclure que tout se passe dans tous les brassins de toutes les fabriques, comme nous l'avons vu dans l'exemple précédent. Il y a des variétés infinies dans la quantité et la nature des germes ensemencés, la composition des moûts et l'activité des levures. Tout ce que nous pouvons retenir est que, dans un brassin normal, tous les germes du groupe coli peuvent être éliminés : l'élimination peut d'ailleurs se poursuivre plus loin et réduire encore davantage le nombre des

espèces survivantes à la clarification; mais *cette épuration biologique débute régulièrement*, comme nous le laissait deviner l'étude comparée des flores dominantes, précisément *par ce groupe même des bactéries que nous avions considérées comme suspectes.*

*
* *

Il y a donc parallélisme entre les diverses phases d'un brassin en voie d'épuration, et la série de nos inventaires de flores dominantes, rangées d'après leur teneur décroissante en coli.

Nous sommes par suite autorisés, semble-t-il, à considérer les divers échantillons rangés d'après cette méthode, comme les produits de fermentations plus ou moins parfaites, c'est-à-dire chez lesquelles le processus normal d'épuration biologique a été arrêté à un stade plus ou moins avancé. La date de cet arrêt est, à quelques heures près, la même pour tous les brassins : c'est, selon toute vraisemblance, celle de la fin de la fermentation principale et de la clarification, après lesquelles la composition chimique du milieu ne subit plus que des changements très lents. La période active des facteurs encore inconnus qui concourent à l'élimination du coli étant toujours à peu près égale, seules doivent varier la rapidité et l'intensité de leur action.

FACTEURS DE L'ÉPURATION

§ 1. — *Modifications du milieu dues à la pullulation du coli et à celle des microbes concurrents.*

Quels peuvent être ces facteurs, et comment agissent-ils? Ce problème est d'une telle complexité que nous n'osons en promettre la solution à nos lecteurs. Ceux-ci voudront bien, nous l'espérons, considérer ce qui suit beaucoup moins comme une véritable explication que comme une série d'observations et de remarques destinées à limiter le champ des hypothèses.

1° Le coli n'est éliminé par aucun des éléments chimiques contenus dans le moût houblonné, stérile. La meilleure preuve est qu'il y cultive non seulement fort bien, mais même mieux

que presque tous les autres germes, exception faite pour ceux appartenant à son propre groupe.

2° Le coli ne s'élimine pas de lui-même, comme il arrive dans les vieilles cultures, par épuisement du milieu et accumulation de ses propres déchets. Même ensemencé seul, de façon massive, et maintenu à l'étuve, il n'atteint même pas en quatre jours son acidité d'arrêt, à plus forte raison en est-il de même avec des ensemencements discrets, à 16 ou 18 degrés, à la suite desquels nous avons pu le cultiver avec succès dans le filtrat de cultures vieilles de cinq jours.

3° Il n'est pas éliminé par les autres bactéries.

Ce n'est pas sans un mûr examen que nous avons rejeté cette hypothèse, car la succession des formules bactériologiques établies pour un brassin en fermentation nous rappelait singulièrement celle que MM. Tissier et Gasching ont notée dans leurs études sur la fermentation spontanée du lait. Dans celle-ci, des ferments mixtes faibles, comme le coli et le *B. aerogenes*, étaient arrêtés dans leur multiplication par le développement des ferments mixtes forts (entérocoque, *B. acidiparalactici*, *B. lactopropylbutyricus*) ; puis, après une phase durant laquelle les champignons détruisaient les acides et commençaient la digestion des albumines, pullulaient les ferments simples appartenant pour la plupart au groupe *mesentericus subtilis*.

Malgré l'analogie apparente des formules, aucune assimilation ne peut être établie entre les deux séries de phénomènes. Tandis que MM. Tissier et Gasching étudient surtout *l'arrêt des actions fermentatives* de germes restés présents et vivants, nous avons en vue la *destruction* de ceux-ci, destruction constatée par des ensemencements restés négatifs. Et l'ordre suivant lequel les espèces sont éliminées dans le moût ne reproduit que très imparfaitement celui suivant lequel elles voient leur action fermentative inhibée dans le lait. Des sarcines, de petits cocci qu'il nous faut considérer comme des ferments mixtes très faibles, puisque, bien qu'ils fabriquent assez d'acide aux dépens des sucres pour faire virer le tournesol des milieux de Barsiekow, ils n'atteignent pas le taux infime de 0,30 à 0,40 (en SO^4H^2 °/₀₀) nécessaire pour y précipiter la nutrose, *survivent* régulièrement dans un brassin à des coli où à des *aerogenes*

produisant jusqu'à 1,60 ou 1,80 d'acidité. Le moût lui-même, d'ailleurs, ne s'acidifie que fort peu durant la fermentation, passant par exemple de 0,55 ou 0,60 au début, à 0,85 ou 1, à la fin, chiffres calculés, il est vrai, après élimination de l'acide carbonique, mais certainement insuffisants pour expliquer à eux seuls l'arrêt de développement des germes du groupe coli *aerogenes*, à plus forte raison, leur mort.

Enfin, un argument, à notre avis, décisif contre l'hypothèse de l'élimination du coli par les germes microbiens concurrents, nous est fourni par une série d'expériences où, ayant cultivé en moût, à la température des caves (16°-18°) les germes les plus fréquents rencontrés par nous dans les bières (3 *B. aerogenes*, 1 *B. hordeicola*, 1 *B. ochraceus*, 3 *B. mesentericus*, 2 *B. subtilis*, 2 entérocoques, 3 cocci ferments mixtes faibles, 1 *sarcina flava*, 1 *B. fæcalis alcaligenes* et 1 *B. acidiparalactici*), nous avons ensuite ensemencé le coli dans les cultures filtrées. Dans presque tous les tubes, il a poussé facilement. Dans quatre tubes provenant de cultures d'*aerogenes*, de *B. hordeicola* et de *B. ochraceus*, où l'on percevait à peine quelques ondes moirées, il a suffi de neutraliser l'excès d'acidité à la soude pour le voir se développer vigoureusement. Dans trois tubes où avaient été cultivés deux *mesentericus* et un *subtilis*, et qui étaient restés clairs, on a obtenu des cultures abondantes par simple addition de bouillon concentré. En aucun cas le coli n'a été tué, même en plusieurs jours, dans ces filtrats de cultures.

Nous avons, dans une autre série d'expériences, mis le coli en concurrence avec des souches vigoureuses de bacille lactique, l'une provenant de l'Institut Pasteur, l'autre isolée d'une macération de malt. Dans les deux cas, les ballons de moût ensemencés étant laissés à la température de 16 ou 18 degrés, le coli était parfaitement vivant au bout du cinquième jour et même bien au delà, et il cultivait encore ou tout au moins ne périssait pas dans les filtrats de cultures pures de bacilles lactiques âgées de quatre jours, et maintenues durant ce délai entre 16 et 18 degrés.

Ainsi donc, dans des conditions les plus favorables, tout ce qu'ont pu faire les concurrents du coli est de modifier le milieu de manière à empêcher ou à ralentir sa germination. Or, ce qui est réalisé dans le moût, ce n'est pas seulement l'arrêt de la

multiplication du coli, c'est sa destruction. Celle-ci ne peut donc être le fait des microbes concurrents.

§ 2. — *Action de la levure.*

Elle est, avant tout, celui de la levure. Ce qui constitue la différence fondamentale entre la fermentation spontanée du lait et la fermentation en brasserie, c'est l'introduction initiale, dans cette dernière, d'un organisme formidablement plus puissant comme quantité et comme activité, que tous les microbes concurrents. Que la levure puisse, à elle seule, transformer le moût en un liquide impropre à la *culture* du coli, il est facile de le montrer. L'expérience suivante nous suffira pour le moment.

Un ballon de moût a été ensemencé de levure pure. Au quatrième jour, la levure a achevé sa fermentation, 68 p. 100 du sucre sont détruits, ce qui est à peu près l'atténuation obtenue en brasserie. Acidité initiale 0,55. Acidité terminale 0,70, sans CO^2. On filtre et on répartit en trois tubes qu'on ensemence de coli. Le lendemain, aucune culture apparente. Pas plus de résultat en trois jours.

1° On ajoute alors à l'un des tubes une quantité de maltose suffisante pour rétablir le taux initial du sucre dans le moût : le tube reste clair, même au bout de plusieurs jours, bien que le coli y soit vivant.

2° Dans un deuxième tube, on ajoute X gouttes de bouillon concentré exactement neutre : le lendemain, ondes moirées nettes; mais les jours suivants, ces ondes ne deviennent pas plus denses. Le milieu ne se trouble pas davantage.

3° Dans le troisième tube, on neutralise exactement l'acidité par de la soude : le tube se trouble légèrement en vingt-quatre heures. En quarante-huit heures, le trouble est intense, comme celui d'une culture de bouillon.

Ainsi donc : 1° la restitution du sucre détruit est restée sans action; 2° l'enrichissement du milieu en peptones sans neutralisation a permis une reprise passagère de la vitalité du germe, reprise immédiatement arrêtée par l'augmentation d'acidité consécutive; 3° la neutralisation sans enrichissement a été suivie d'une pullulation durable, ce qui prouve que les réserves étaient

suffisantes et que l'acidité agissait comme influence empêchante, bien qu'elle fût *très au-dessous* de l'acidité d'arrêt normale du coli.

Rien ne serait en somme plus aisé que d'expliquer pourquoi le coli se *multiplie mal* en présence de la levure. Rien n'est plus difficile que de dire pourquoi il *meurt*. L'hypothèse maintes fois émise d'une action directement bactéricide des diastases de la levure, de la zymase en particulier, est séduisante. Malheureusement, elle est rendue peu vraisemblable par le fait que, stérilisant soit par ébullition à découvert, soit en tubes scellés, des bières reconnues bactéricides, nous ne les avons pas vues se montrer plus favorables aux microbes, après la destruction de leurs diastases thermolabiles et de l'élimination de leurs acides volatils. Il nous semble que la solution de ce problème très complexe devrait être très rapprochée par la connaissance, qui nous manque absolument, de la nature exacte des matières azotées subsistant dans le moût. Il n'est pas certain que toutes soient utilisables par les microbes, et le simple dosage global de ces produits donne peut-être à tort l'illusion d'un milieu de culture assez riche. Nous trouvons une confirmation de cette hypothèse dans le fait que, dans nos essais d'ensemencement de coli en cultures filtrées, c'est précisément dans les tubes où avaient vécu des protéolytiques qu'il s'est développé le plus mal. Peut-être l'appauvrissement du milieu en corps azotés, peu important au point de vue chimique, est-il décisif s'il porte sur des aliments à la fois essentiels et rares. A cet appauvrissement peuvent alors se joindre une foule de minimes actions bactéricides, qui eussent été sans importance en un milieu riche : celle des acides fixes, celle des résines de houblon, celle des acides tartrique ou sulfureux lors de la clarification ; et peut-être, durant la fermentation, celle des diastases. C'est ainsi qu'en l'absence de documents plus précis, nous nous représentons le rôle de la levure dans l'épuration d'un brassin. Mais il faut insister sur ce fait que ce rôle n'est pas fatalement rempli ; qu'il l'est seulement lorsqu'un concours de circonstances, défavorables aux microbes (pollution légère, basse température des caves, acidité initiale du moût, houblonnage abondant, etc.), et favorables à la levure (levure pure, active, en proportions convenables ; moût riche en sucre et pauvre en dextrines supérieures, température assez

basse, etc.), sont réalisées. Rien d'étonnant dès lors, à ce que les brasseurs chez lesquels nous rencontrons les germes suspects se soient souvent plaints à nous d'irrégularités dans leurs fermentations, d'insuffisante production de levure, qu'ils attribuaient à la mauvaise qualité du malt, et à ce que nous ayons pu relever nous-même des erreurs de technique comme l'usage de riz en excès, ou la pratique de trempes trop chaudes capables de dissoudre même l'amidon non saccharifié.

Si nous arrivons ainsi à nous représenter, quoique bien imparfaitement, les causes de la mort du coli, nous sommes absolument hors d'état de fournir la moindre raison de l'inégale résistance des germes d'un brassin, à des influences qui doivent s'exercer sur tous. Leur classement d'après le taux respectif de leurs acidités d'arrêt ne nous fournit aucun renseignement à ce sujet, puisqu'il s'agit non seulement d'un arrêt de développement, mais d'une destruction, et que, d'ailleurs, de très faibles ferments mixtes échappent à celle-ci plus souvent que le coli. Il faut donc nous contenter de constater l'existence d'un ordre régulier dans les éliminations successives ; et c'est d'ailleurs tout ce qui est nécessaire à nos recherches actuelles.

QUATRIÈME PARTIE

LA LUTTE CONTRE L'INFECTION DES BIÈRES PAR LE COLI

CHAPITRE PREMIER

SIGNIFICATION DE LA PRÉSENCE DU COLI DANS UNE BIÈRE

§ 1. — *Action physiologique des bières colifères et non colifères.*

Lorsque nous avons pour la première fois déclaré suspectes des bières colifères, c'était, avant toute enquête, par une simple extension à ces boissons, d'une règle appliquée à l'appréciation des eaux d'alimentation. Cette application se justifie-t-elle encore, maintenant que nous sommes exactement renseignés sur le mode d'introduction du coli dans un brassin et sur les conditions de sa survivance?

Les faits suivants, en partie cliniques, en partie expérimentaux, vont nous permettre d'établir les propositions suivantes :

1° Les bières colifères peuvent être pathogènes, même sans prédisposition apparente du sujet.

2° Les bières non colifères peuvent être pathogènes, au moins quand il y a, chez le sujet, une prédisposition créée, par exemple, par une affection intestinale antérieure. Il semble qu'elles agissent en provoquant une perturbation de la flore intestinale normale, et en réveillant ainsi l'activité des pathogènes préexistants.

La première observation, que nous devons à l'obligeance de M. le médecin-major H. Tissier, montre l'action d'une bière colifère sur un tube digestif normal :

Observation I. — Adulte, quarante-neuf ans, médecin aide-major à l'ambulance... du... corps, au front depuis le mois d'octobre 1914.

Bonne santé apparente. Aucune indisposition pendant le cours de la campagne, malgré les fatigues causées par les déplacements fréquents au cours de la bataille de l'Yser (octobre-novembre 1914) et malgré le milieu (cas assez nombreux de typhoïde et de diarrhée des tranchées).

Régime très sévère, suivi depuis octobre 1907; exclusivement végétarien.

Aucun trouble gastro-intestinal antérieur. Très bon état général au moment de l'indisposition ci-après décrite.

Le 20 août 1915, au cours d'une promenade à bicyclette à R..., le sujet prend un verre de bière à l'estaminet X, qui cependant venait d'être consigné à la troupe comme livrant une bière suspecte (plus de 1.000 coli).

Le lendemain 21. Léger malaise général sans troubles gastro-intestinaux bien nets.

Le 22. Le malaise s'accentue; inappétence. Coliques amenant une selle d'abord molle, puis liquide. Température 38°,2.

Le 23. Le malaise augmente, inappétence, alimentation restreinte à deux potages dans la journée, et un chocolat à l'eau le matin. Les coliques sont plus fortes. Dans l'intervalle, sensation de pesanteur abdominale, et parfois, de griffe. 2 selles liquides avec glaires. Température matin : 37°,6; soir : 38°,6.

Le 24. Légère amélioration de l'état général. L'appétit revient sensiblement. Alimentation 2 potages : l'un léger, farineux, l'autre avec pâtes alimentaires. Coliques plus sourdes; mais persistance de la sensation de pesanteur abdominale. 2 selles molles mélangées de glaires. Température matin : 37°,7; soir : 38°,2. Pouls matin : 76; soir : 82.

Le 25. Le malaise disparaît; l'appétit redevient normal. L'alimentation est reprise comme d'habitude. Les coliques disparaissent. La sensation de pesanteur persiste légèrement, pas de selles. Température matin : 36°,7; soir : 37°,6. Pouls matin : 64; soir : 76.

Les selles reprennent leur consistance normale et leur régularité deux jours après; mais, longtemps après cette indisposition, le sujet remarque encore une sensation pénible de poids siégeant le long du côlon transverse, du côlon descendant, de l'anse oméga et du rectum.

L'observation suivante montrera, au contraire, l'action d'une bière non colifère (bière D) sur un intestin prédisposé.

Observation II. — Adulte, trente-deux ans, aide-major.

Bonne santé depuis le début de la campagne. Régime mixte très varié; peu de viande, beaucoup de poisson.

Aucune indisposition gastro-intestinale depuis six mois au moins, quand, le 11 janvier 1916, à la suite d'ingestion de moules insuffisamment cuites, surviennent, au bout de vingt heures environ, des coliques d'intensité croissante suivies d'émissions de selles molles

puis diarrhéiques. 10 selles dans les premières vingt-quatre heures, dont 6 la nuit et 4 le jour. Ces selles sont de moins en moins abondantes et, dès la quatrième, ne sont plus diarrhéiques, mais molles et mélangées de glaires. Le ténesme est très marqué. L'intestin est très sensible dans l'intervalle des coliques.

Pas de phénomènes généraux, sauf l'inappétence. Pas de fièvre.

Le lendemain, même état : 8 selles, dont 6 la nuit.

Le surlendemain, 4 selles.

Les jours suivants, l'intestin reste très sensible, et les selles, réduites à 2 ou 3 par jour, sont précédées de besoins subits et impérieux.

Effacement graduel de tous les symptômes.

L'alimentation, suspendue durant le premier jour, est reprise progressivement : potages, puis aliments solides végétariens, puis poisson. Au bout de huit jours seulement, un peu de viande.

Jusqu'à ce moment, le sujet avait consommé à tous ses repas et depuis plusieurs mois, une bière toujours de même origine et maintes fois vérifiée non colifère.

Dès l'instant où, remis de l'indisposition précédente, il reprit cette même bière, l'absorption même de faibles doses fut infailliblement et très rapidement (trois ou quatre heures après) suivie de coliques et de besoins impérieux. 3 ou 4 selles molles, quelquefois un peu glaireuses, étaient ainsi émises, dans la première journée, 2 ou 3 dans la seconde, et tout ce syndrome disparaissait ensuite, pour être de nouveau provoqué régulièrement, à chaque ingestion de cette même bière.

Celle-ci fut donc complètement exclue de l'alimentation du sujet pendant plus d'un mois, et, durant toute cette période, le régime restant exactement sans changement, aucun trouble intestinal appréciable ne fut remarqué.

Nous résolûmes alors, d'accord avec M. Tissier, de faire ingérer aux sujets des observations I et II cette même bière D, dont, par ailleurs, nous établissions la flore fondamentale.

Celle-ci était caractérisée par une prépondérance très marquée de bactéries acidifiantes : *B. lactyl-lacticus* et quelques autres lactiques, et bacilles correspondant aux descriptions du *B. acidophilus* de Moro et du *B. exilis* de Tissier. Ces bacilles fournissaient, pour une goutte, 4 à 500 colonies. Moins nombreux déjà étaient les cocci de type entérocoque (150). Presque rares, par comparaison, étaient les levures (7), et quelques cocci, ferments mixtes faibles, *M. candidus*, *M. luteus*, sarcines (deux ou trois de chaque espèce par goutte).

I. — Le sujet de l'observation I, qui s'était, depuis l'incident mentionné dans celle-ci, rigoureusement abstenu de bière,

absorba durant trois jours une moyenne de 3/4 de litre de celle que nous venions d'étudier. Il n'observa aucune modification notable ni dans le nombre, ni dans l'apparence de ses selles.

L'analyse bactériologique de celles-ci démontra seulement à M. Tissier que leur flore fondamentale avait été très modifiée, en même temps qu'elle lui permettait d'isoler un anaérobie nouveau, encore à l'étude, que nous arrivions presque en même temps à retrouver dans une autre bonne bière de la région.

II. — Le sujet de l'observation II absorba sans aucune espèce de modification appréciable, dans le nombre ou la nature de ses selles, 25 centimètres cubes d'une belle culture en bouillon glucosé de bacille lactique qui constituait l'espèce dominante de la bière D (*B. lactyl-lacticus*).

Quarante-huit heures après, il introduisit de nouveau cette bière dans son régime habituel (3/4 de litre par jour), et ne put observer le plus léger trouble intestinal, alors que, quelques semaines auparavant, un seul verre suffisait à provoquer un véritable syndrome dysentérique. A plusieurs reprises depuis lors, la même bière a été consommée sans le moindre inconvénient.

Ces observations et ces essais, confirmés d'ailleurs par ce qu'a pu nous apprendre le témoignage de plusieurs personnes consommant des bières de la région et sachant s'observer avec soin, semblent bien établir que les *bières colifères* peuvent, même chez des *sujets absolument sains*, causer des *troubles gastro-intestinaux sérieux*; alors que les *bières exemptes de coli* ne peuvent guère en provoquer que chez des *sujets prédisposés* par des infections antérieures du tube digestif.

§ 2. — *Le coli comme témoin d'une épuration biologique incomplète du brassin.*

Il y a donc des raisons sérieuses, basées sur le mode d'action probable des bières colifères sur les flores intestinales, pour rejeter ces bières de l'alimentation. Mais on peut encore les considérer comme suspectes à d'autres titres. Ce que nous savons des conditions de la *disparition du coli* dans les bières nous montre que celle-ci est seulement la *première étape d'une sim-*

plification progressive de la flore. Là où il existe, existent aussi, quoique peut-être à l'état de vie ralentie et attendant leur tour de pulluler, tous les autres germes qui pourront ultérieurement apparaître en abondance dans la bière. Si donc il faut préférer les bières exemptes de coli aux bières souillées de ce germe, ce n'est pas seulement parce que ce bacille est en lui-même suspect; ce n'est pas parce qu'il est le témoin d'une souillure d'origine organique, et l'indice de la possibilité d'une infection par des bactéries pathogènes ; c'est parce qu'il aurait dû être des premiers à disparaître, si la fermentation avait réalisé, au moins partiellement, l'élimination des bactéries parasites. S'il est présent, c'est que subsiste avec lui la totalité des germes ensemencés en moût et capables de vivre dans la bière ; c'est que l'épuration biologique de celle-ci n'est même pas commencée. Ici, comme dans l'analyse des eaux, le coli est un témoin : la signification de sa présence n'est pas la même dans le premier cas que dans le second : elle n'est, ni moins précieuse, ni moins nette. S'il est impossible de proscrire les bières riches en bactéries, puisque toutes en renferment des quantités considérables ; si l'absence du coli dans une bière n'est pas, pour le consommateur, une garantie absolue contre les troubles intestinaux, ceux-ci pouvant être provoqués, nous l'avons vu, par d'autres germes, au moins convient-il de faire un choix, et de ne retenir comme propres à la consommation, que les bières déjà débarrassées d'une bonne part de leurs germes. La recherche du coli nous permet de faire ce choix.

CHAPITRE II

PROCÉDÉS DE DÉFENSE DES BRASSERIES CONTRE L'INFECTION

§ 1. — *Pureté du moût.*

Si nous considérons comme suspectes toutes les bières contenant du colibacille en quantité notable, il y aura donc deux types d'échantillons qui échapperont à cette suspicion : ceux qui n'auront jamais été infectés au cours de leur fabrication, et ceux qui, l'ayant été, se seront purifiés par la suite. Le premier groupe est celui qui, au point de vue théorique, offre le moins d'intérêt. Il va de soi qu'à partir d'un moût stérile et d'une levure pure, on doit obtenir une bière exempte de germes suspects. Mais, au point de vue pratique, l'intérêt de ces cas est très grand, parce que les conditions favorables dont il s'agit ne sont nullement hors de portée pour l'industrie brassicole. Il ne s'agit nullement en effet de réaliser la fermentation strictement aseptique, qui ne peut être obtenue qu'au laboratoire ; mais une simple approximation peut suffire pour l'obtention d'une bière irréprochable, riche encore en bactéries, mais exempte des espèces suspectes et, en particulier, du *B. coli*.

La *stérilité du moût* peut être assurée d'une façon presque complète si, tenant compte de ce qui a été exposé plus haut, sur les conditions habituelles de sa contamination durant son refroidissement, on s'applique à réaliser l'asepsie des surfaces sur lesquelles il passe, durant son trajet des chaudières à la cuve guilloire, et à le protéger, en même temps, contre le dépôt des poussières.

C'est là à la fois une question d'installation matérielle et de soins journaliers. Point n'est besoin de recherches spéciales pour établir qu'il y a intérêt à isoler des étables les locaux de la

brasserie ; et à ne pas loger, comme nous l'avons vu, les concasseurs de malt au-dessus des réfrigérants. Point n'est besoin non plus de discuter ici les avantages ou les inconvénients des divers procédés de stérilisation des appareils. Ce n'est pas, certes, que, dans nos rapports avec les brasseurs, nous ayons négligé ce côté de la question. Bien au contraire, ces conseils de propreté méticuleuse, dont tous étaient à même de reconnaître l'importance, étaient presque les seuls sur lesquels nous insistions auprès d'eux ; et ce sont également ceux sur lesquels le Directeur de l'école de brasserie de l'Institut Pasteur, consulté par eux, s'étendait avec le plus de détails.

Beaucoup des succès remportés dans la lutte contre l'infection, par des brasseries d'abord contaminées, sont dus au redoublement de soins apportés depuis lors aux opérations de lavage et d'assainissement du matériel. A maintes reprises, nous avons vu des brasseries consignées à la troupe depuis des mois, commencer à débiter des bières saines aussitôt après suppression d'une fuite de leur réfrigérant, ou après l'emploi systématique de nettoyages au jet de vapeur pour sa stérilisation. Chez d'autres, un raccourcissement du séjour du moût sur les bacs a donné immédiatement un résultat favorable. Nous ne pouvons pour le moment affirmer que l'obtention d'un moût stérile ou cuve guilloire sera possible dans tous les cas. Les progrès réalisés par les brasseries de notre région datent surtout de l'hiver 1915-1916, et, si nous les avons vus se maintenir et s'accentuer, même durant le printemps, période cependant critique pour la bonne conservation des bières, nous ne savons pas encore ce que nous réserve l'été. On peut prévoir cependant que l'emploi exclusif des bacs, durant la saison chaude, donnera encore quelques mécomptes, quelque soin qu'on prenne pour les tenir propres ; parce que le moût restera forcément trop longtemps exposé aux poussières sur leurs vastes surfaces ; mais un réfrigérant bien entretenu doit, en toutes saisons, débiter un moût pratiquement pur.

§ 2. — *Pureté des levures.*

La *pureté bactériologique absolue de la levure* n'est, de son côté, industriellement réalisable que par l'emploi, à chaque brassin, de pieds de levains sélectionnés, fournis par des établis-

sements sérieux. En fait, même les brasseurs soigneux ne recourent que rarement à cette méthode, estimant avec raison qu'il y a toujours danger à changer une race de levure bien connue, bien acclimatée au type de moût spécial de la maison, pour des races toujours nouvelles. Chaque brassin est donc ensemencé avec une petite partie de la levure produite au cours du brassin précédent, et conservée dans l'intervalle, soit à l'état frais dans de simples cuviers, soit après dessiccation partielle par expression dans des sacs de tissu très serré, soit dans des récipients métalliques très résistants, dits « levuriers », où l'acide carbonique dégagé par les cellules encore actives se charge lui-même d'effectuer cette expression au travers d'un fond perforé, doublé en dedans d'une toile épaisse.

Mais, quelles que soient les précautions prises, un pied de levain déjà utilisé n'est jamais exempt de bactéries ; et il ne faut compter, pour le purifier, ni sur la disparition des germes pendant le repos de la levure, ni sur les procédés mécaniques de lavage.

La levure inactive n'a pas d'action bactéricide, et nous avons obtenu, pendant plus d'un mois et demi, des cultures abondantes de coli à partir d'un tube de levure sélectionnée où nous avons ensemencé ce bacille.

Le lavage des levures consiste à émulsionner celles-ci dans une quantité d'eau pure, additionnée ou non d'une très faible quantité d'antiseptiques, à les recueillir quand elles se sont déposées, et à les séparer par décantation de la masse d'eau surnageante, qui entraîne une forte proportion de bactéries et de matières organiques. Nous avons eu l'occasion d'exposer ailleurs comment, par un procédé indiqué par M. Duflos, de Dunkerque, cette opération, régulièrement et facilement applicable aux bières de fermentation basse, qui retombent d'elles-mêmes au bas du récipient dès qu'on cesse d'agiter l'émulsion, peut être pratiquée avec les bières hautes, dont l'émulsion reste naturellement homogène, ou ne se décante qu'en vingt-quatre heures ou plus. Ce résultat est, au contraire, dans le procédé Duflos, obtenu instantanément par l'addition d'un peu d'acide acétique (2 centimètres cubes d'acide du commerce par litre d'émulsion dans nos expériences). Mais ces procédés de lavage n'assurent nullement à la bière une pureté bactériologique même approximative.

Dans nos expériences les plus heureuses, nous avons vu le chiffre des microbes tomber dans la proportion de 4 à 1, résultat appréciable sans doute, mais très éloigné encore de la perfection.

§ 3. — *Fermentations actives.*

Ainsi donc, même dans les circonstances les plus favorables et dans les brasseries les plus soigneuses, la fabrication de la bière ne se fait jamais sans que des bactéries ne soient introduites dans la fermentation, et rien ne garantit que ces bactéries n'appartiennent pas aux groupes suspects. Cependant, ces brasseries livrent régulièrement une bière irréprochable. Dans leurs fermentations mêmes interviennent donc déjà des facteurs dont nous avons signalé l'importance en montrant comment des brassins fortement souillés à l'origine pouvaient subir une véritable épuration biologique et aboutir à la production d'une bière saine. Ces facteurs sont certainement nombreux et, pour une bonne part, inconnus.

Mais nous savons cependant que, parmi les conditions qui accélèrent la disparition du coli, figurent toutes celles qui facilitent le travail de la levure, et qu'un brassin bactériologiquement souillé est souvent défectueux au point de vue même de la technique brassicole. Les spécialistes qui définissent les meilleures conditions du maltage, du brassage et de l'ensemencement des bières font donc, du même coup, office d'hygiénistes et nous n'avons pas à usurper le rôle qui leur revient.

En réalité, si, depuis le début de notre enquête, les résultats de nos analyses nous ont montré une proportion croissante de bières bactériologiquement pures, ce ne sont pas des procédés réellement nouveaux qui doivent en recueillir le mérite. La grande majorité des brasseurs sérieux se sont contentés de veiller à la propreté scrupuleuse des appareils, à la provenance et à la pureté des levures employées, au bon choix des malts; à tout ce qui, en un mot, pouvait leur permettre de réussir de bonnes fermentations. Les résultats obtenus sont mieux qu'encourageants.

CHAPITRE III

LES RÉSULTATS

Nous avons, dans l'un de nos premiers chapitres, résumé les analyses faites au laboratoire d'armée pendant le premier trimestre qui a suivi le début de notre enquête. Depuis ce moment, nous n'avons pas cessé de suivre attentivement les efforts faits par les brasseurs pour remédier aux défauts de leur fabrication. Si nous établissons mois par mois la proportion des échantillons déclarés bons (moins de 1.000 coli par litre), les progrès obtenus seront déjà assez nets.

Juillet 1915	75 examens.	Bières bonnes.	34,6 %
Août.	55 —	—	29 —
Septembre	110 —	—	34 —
Octobre	37 —	—	32 —
Novembre	37 —	—	43 —
Décembre	56 —	—	53,5 —
Janvier 1916	59 —	—	35,7 —
Février.	46 —	—	50 —
Mars.	54 —	—	53 —
Avril.	25 —	—	56 —

L'amélioration sensible obtenue dès les premiers mois a été, on le voit, interrompue en janvier : elle coïncide avec une période de surproduction et de fabrication hâtive et un peu négligente, due à quelques jours fériés. Sous cette réserve, le relèvement de la statistique est très net.

Cependant, il est très loin de donner une idée des résultats obtenus ; car, sur l'ordre de l'autorité militaire, les prélèvements étaient multipliés dans les brasseries suspectes et s'espaçaient dans celles dont la production était irréprochable. Ce qu'il faut considérer, c'est surtout la proportion de ces derniers.

Elle a augmenté d'une façon saisissante. A Dunkerque même.

où toutes les brasseries, sauf 3, livraient des bières pures de coli, il n'y en avait plus, depuis plusieurs mois, qu'une seule suspecte sur 9; il a suffi, pour cette dernière, que le directeur voulût bien abréger le séjour du moût sur les bacs, pour que cette fâcheuse exception disparût. A Bergues, ville voisine, où 5 brasseries sur 9 étaient classées comme mauvaises (d'après notre critérium), il n'y en a plus aujourd'hui que deux, et l'une d'elles fournit de temps à autre une bière pure. Sur tous les points de notre secteur où les brasseurs ont senti la nécessité de soins plus méticuleux, les mêmes résultats ont été enregistrés. Nos analyses défavorables ne concernent plus, en général, que quelques petits établissements de village, ne produisant, à eux tous, qu'une infime partie de la bière consommée dans la région. En particulier, la statistique spéciale des estaminets alimentés en général par les grandes brasseries, est excellente. Non seulement à Dunkerque, mais dans des faubourgs éloignés ou de simples villages, la bière colifère devient rare. Dans trois petites agglomérations, situées assez loin de la grande ville, nous avons pu, au mois de mars, faire 17 prélèvements sans rencontrer un seul échantillon suspect.

Si nous songeons maintenant que l'élimination constatée du coli permet presque d'affirmer du même coup celle de toutes les bactéries suspectes du groupe *coli-aerogenes*, et en particulier celle des pathogènes comme les bacilles typhiques, paratyphiques, et dysentériques; que sa présence, au contraire, indique la possibilité d'une souillure initiale sérieuse, et l'insuffisance de l'épuration biologique spontanée de la bière, nous mesurerons toute la valeur de ces résultats. L'éveil donné aux brasseurs de toute une vaste région a été entendu et compris. L'effort ainsi suscité porte déjà ses fruits et il se poursuivra, nous l'espérons, alors même que les prescriptions de l'autorité militaire auront cessé de l'imposer comme une nécessité. Nous croyons fermement que notre laboratoire d'armée a fait ici œuvre utile; l'avenir dira s'il a fait œuvre durable.

APPENDICE

I

GROUPE SUBTILIS-MESENTERICUS

Nous avons rencontré un grand nombre d'espèces se rapprochant soit du *B. subtilis*, soit du *B. mesentericus*, c'est-à-dire ayant en commun les caractères suivants. Forme : bâtonnets de 2 à 4 μ en moyenne, mobiles dans les cultures jeunes, capables de s'allonger en véritables filaments ou de constituer des chaînettes. Production de spores. Liquéfaction de la gélatine et du sérum coagulé. Éclaircissement du lait par peptonisation de la caséine. Production d'acides aux dépens des sucres nulle (*subtilis*) ou faible (*mesentericus*), et dans tous les cas incapable d'exercer une action d'arrêt sur les diastases du microbe, d'où tendance à l'alcalinisation du milieu. Les microbes restent colorés par le Gram. Un très grand nombre d'espèces, les unes assez bien décrites, les autres caractérisées d'une façon très rudimentaire dans les ouvrages classiques, doivent être réunies dans ce groupe et rapprochées, soit du *B. subtilis* typique, quand elles sont strictement aérobies, soit des variétés bien connues du *B. mesentericus*, quand elles sont facultativement anaérobies.

Tous ces germes, simples saprophytes, et d'ailleurs sans action sur la fermentation principale, n'ayant, à notre point de vue spécial, qu'un intérêt très secondaire, nous ne reproduirons pas ici les descriptions des espèces isolées par nous. Signalons seulement la prépondérance considérable dans nos échantillons, des anaérobies facultatifs voisins du *B. mesentericus*, sur les aérobies stricts proches du *subtilis*.

II

GROUPE COLI-AEROGENES

B. Coli (*Escherisch*).

Le *B. coli* est une des espèces bactériennes les mieux connues. C'est, d'après les définitions de Tissier, un ferment mixte faible : dans un milieu à la fois sucré et peptoné, son acidité d'arrêt est assez peu élevée (0,50 et 1,60 sont presque les limites extrêmes).

Nous avons rencontré 7 fois sur 10 la variété dite *B. coli commune*, qui ne fait pas fermenter le saccharose, et 3 fois sur 10, la variété dite *B. coli communior*, qui attaque ce sucre.

L'inoculation de 2 centimètres cubes dans le péritoine du cobaye a amené la mort de l'animal, par péritonite et septicémie, dans les 8/10 des cas.

Paracoli.

Nous ne regardons comme paracoli, que des germes produisant de l'indol, car le rapprochement avec le coli d'un germe n'ayant de commun avec lui que ses dimensions, sa forme, sa mobilité, ses réactions aux procédés de coloration et même ses propriétés fermentatives sur les sucres ne nous paraît pas légitime, s'il ne s'y ajoute cette propriété très importante et très constante. Le seul type de paracoli bien net que nous ayons rencontré dans les bières est un petit bacille ne différant du coli vrai que par une extrême lenteur dans son attaque du lactose et dans la coagulation du lait (coagulation le vingt et unième jour pour un échantillon, le vingt-troisième pour un autre) ; et par une culture sur gélatine extrêmement mince, plate, transparente, rapidement étalée à toute la surface du tube, limitée par des bords dentelés ; présentant dans l'ensemble l'aspect d'une couche de collodion séchée sur la gélatine.

B. lactis aerogenes (*Escherisch*).

Le *B. lactis aerogenes*, extrêmement abondant dans la nature, semble constituer une partie véritablement prépondérante de la flore du malt. On le rencontre presque toujours dans les levures utilisées par les brasseries flamandes, dans des proportions parfois supérieures à celles de tous les autres germes microbiens réunis. Présent au début de presque toutes les fermentations, il survit en abondance dans une bonne part des bières achevées. Ses caractères ne sont pas constants : nous en avons rencontré plusieurs races bien distinctes.

1° *B. aerogenes typique* : petit bacille coliforme à bords arrondis, présentant fréquemment un corpuscule central réfringent; formes jeunes en coccobacilles; formes âgées et formes d'involution fréquemment filamenteuses ou, au contraire, en gros ovoïdes à centre clair. Taille moyenne identique à celle du coli (2 à 4 μ). Immobile, même après une série de repiquages et passage en bile. Ne prend pas le Gram.

Bouillon et eau peptonée : trouble précoce, intense, homogène, avec ondes moirées bien nettes. Puis, pellicule fragile à la surface et dépôt muqueux au fond du tube.

Gélose inclinée. — Culture luxuriante, épaisse, gluante, descendant en goutte visqueuse vers le bas du tube (comparaison classique avec le fromage avancé). Bords nets, en talus. Couleur blanchâtre.

Gélose en piqûre. — Disque blanc saillant; épais de 2 millimètres ou plus au bout de quinze jours, culture moins vigoureuse le long du trait.

Gélatine. — Culture blanche, épaisse, saillante. Pas de liquéfaction.

Pomme de terre. — Culture épaisse, grasse et brune. Le milieu lui-même est rarement bruni. Fréquemment, des bulles gazeuses se dégagent de la culture.

Gélose en plomb. — Masse non virée. L'eau d'exsudation, en surface, est noircie.

Gélose sucrée Veillon. — Colonies sur toute la hauteur. Formation de bulles gazeuses. Dès que l'ensemencement n'est pas trop pauvre, formation en surface d'une couche blanche épaisse.

Ce caractère, déjà signalé par Tissier, nous semble très typique et très constant.

Lait tournesolé. — Viré et coagulé avec une rapidité très variable; en général quarante-huit heures ou trois jours, rarement moins, assez souvent plus. Ford (1) insiste avec raison sur ce caractère : « La coagulation peut être retardée jusqu'à quinze ou vingt jours, mais se produit toujours à un moment donné. Elle peut fréquemment être hâtée par de rapides changements de température. Un bacille qui, en certains spécimens de lait, ne coagule que très tardivement, coagule d'autres échantillons en moins de trois heures. »

Gélose lactosée tournesolée. — Culture luxuriante et grasse. Virage au rouge en un temps variable, deux à trois jours en moyenne.

Gélose Rothberger. — Éclatement du milieu en vingt-quatre heures. Virage au jaune fluorescent plus ou moins précoce (en moins de cinq jours en moyenne).

Les sucres sont attaqués avec formation d'acides et de gaz, les acides formés sont, avec l'acide carbonique, les acides lactique, acétique, formique et succinique.

Il y a de nombreuses variations en ce qui concerne l'attaque des sucres. La fermentation du glucose et du lactose étant considérée comme constante, Ford décrit sous le nom de *B. duodenale*, un *aerogenes* qui respecte le saccharose. Nous avons rencontré :

1° La variété faisant fermenter : glucose, lévulose, galactose, maltose, mannite, dulcite, arabinose et saccharose (*B. aerogenes*).

2° Une variété attaquant ces mêmes sucres, moins la dulcite et le saccharose (*B. duodenale* de Ford); elle nous semble un peu moins fréquente que la première. Sur 8 chantillons, 5 attaquaient le saccharose. Même les échantillons qui respectent le saccharose attaquent l'arabinose.

Pas de production d'indol en milieu peptoné.

Réduction des nitrates en nitrites constante et rapide.

Acidité d'arrêt comprise entre 1,60 et 1,86 (acide carbonique compris).

(1) W.-W. Ford. The classification and distribution of the intestinal bacteria in man, p. 56.— Studies from the royal Victoria hospital Montreal, vol. I, n° 5.

Nous ne faisons pas mention dans cette description de capsules entourant le microbe en milieu animal. L'accord, d'ailleurs, est très loin d'être fait à leur sujet entre les auteurs. Tandis que, pour certains, la présence de cette capsule est suffisamment caractéristique pour autoriser le classement du microbe dans un groupe spécial de bacilles encapsulés (Cf. la classification de Clairmont (1) et celle de Bertarelli, reprise par Dopter), d'autres [Macé (2), Ford (3)] mentionnent seulement l'*aspect encapsulé* que prend le bacille dans l'organisme.

Nous partageons entièrement ce point de vue : il n'y a rien de commun entre ces fausses capsules et les gaines véritables qui entourent certains microbes (leuconostocs, *ascobacterium*, etc.).

Deuxième variété. B. aerogenes mobile (*Variété nouvelle*). — Le *B. aerogenes* des descriptions classiques est toujours présenté comme immobile. Or, nous rencontrons à chaque instant, dans les malts et dans les bières, un petit bacille identique en tous points au *B. aerogenes*, à ceci près qu'il est très mobile, d'une mobilité souvent égale à celle du bacille typhique. Les caractères culturaux sont ceux du *B. aerogenes* le plus typique ; en particulier, la viscosité sur gélose est extrême. En ce qui concerne la fermentation des sucres, nous trouvons également, comme pour le *B. aerogenes* classique, deux sous-variétés bien nettes : l'une faisant fermenter glucose, lévulose, galactose, maltose, mannite, arabinose, saccharose et dulcite ; l'autre, respectant ces deux derniers.

L'attaque du lactose, déjà très inégale suivant les races de *B. aerogenes* typiques, est ici régulièrement assez lente ; la coagulation du lait prend en moyenne trois jours ; Mais surtout cette fermentation semble aisément entravée. Si, en effet, au lieu d'employer comme milieu solide la gélose lactosée, on utilise un milieu légèrement antiseptique comme la gélose de Drigalski, les colonies, même bien développées, restent bleues ; ou, dans des cas très rares, virent au rouge violet quelques

(1) Clairmont. Differentialdiagnostische Untersuchungen über Kapselbakterien (*Zeitsch. für Hygiene*, t. XXXIX, 1902, p. 1).
(2) Macé. *Traité pratique de bactériologie*, 6e édit., vol. II, p. 222.
(3) Ford. Ouvrage cité, p. 56.

heures, puis redeviennent bleues. Le fait nous a paru presque constant pour les *aerogenes* des bières, et il l'est tout à fait pour la variété mobile. Par contre, nous nous sommes assuré que la souche de l'Institut Pasteur et un *aerogenes* extrait des eaux viraient nettement le Drigalski.

Troisième variété. — Bacilles immobiles ne différant de la description classique que par les caractères des cultures sur gélatine. Celles-ci forment une couche extrêmement mince, plate, sèche, transparente, s'écartant beaucoup de part et d'autre de la strie d'ensemencement et fréquemment s'étalant sur toute la largeur du tube. Tous les autres caractères de culture étant ceux du *B. aerogenes* classique, nous aurions à peine mentionné cette variété, si nous n'avions remarqué constamment qu'elle avait sur les sucres une action particulièrement énergique, son acidité d'arrêt dépassant toujours 1,80 et pouvant atteindre 2 p. 1.000 en SO^4H^2.

B. hordeicola (*espèce nouvelle*).

Petit bacille à extrémités arrondies, plutôt plus court et surtout un peu plus étroit que le coli, montrant comme lui, dans les colonies très jeunes, des formes courtes, presque diplococciques, et, dans les cultures anciennes en bouillon, des formes bacillaires deux ou trois fois plus longues que les éléments moyens, mêlées d'ailleurs à ceux-ci et beaucoup plus rares qu'eux. Se colore bien par les colorants basiques et ne prend pas le Gram.

Le *B. hordeicola* est mobile. Assez souvent, il est tel dès la première culture en bouillon (4 fois sur 10); plus généralement, on le trouve d'abord immobile ou animé de simples oscillations; mais toujours on peut lui rendre sa mobilité, soit par repiquage de souches anciennes, conservées en gélose profonde, soit par passage de vingt-quatre ou quarante-huit heures en bile, soit par passage en gélose de Veillon. Cette mobilité est, en général, plutôt moindre que celle du bacille typhique et analogue à celle du *B. coli*.

Vitalité considérable, non seulement en gélose profonde, mais en bouillon. Température optima, 35 degrés. Pousse assez bien

à 16-18 degrés; lentement et peu abondamment au-dessus de 41 degrés.

Bouillon. — Trouble précoce (six à sept heures), dense, homogène. Ondes moirées par agitation. En deux ou trois jours, dépôt très net, pulvérulent, sans éclaircissement du milieu. A partir du troisième jour, quelquefois plus tard, formation en surface d'une pellicule fragile, laissant sur le verre une collerette peu adhérente. Quelquefois, pellicule plus épaisse et blanchâtre, mais toujours fragile, et ne prenant jamais l'aspect d'un voile cohérent.

Eau peptonée. — Trouble moins intense. Mêmes caractères.

Gélose inclinée. — Culture abondante, humide, semi-translucide, bleutée sur les bords par transparence. L'épaisseur moyenne de la culture est comparable à celle du B. paratyphique B, souvent plus considérable. En général, il y a un dépôt muqueux blanchâtre abondant dans l'eau d'exsudation. La colonie isolée est ronde, à bords réguliers, minces et transparents, nettement convexe au début, plus plate par la suite, sans dépression centrale. Elle paraît bien homogène par transparence, le centre étant seulement un peu plus jaunâtre.

Gélose en piqûre. — Développement également rapide le long du trait et en surface. Le disque supérieur, blanchâtre, semi-transparent, couvre en quelques jours toute la surface libre de la gélose. Au bout de quinze jours, il est opaque, épais de 2 à 3 millimètres, et de couleur grisâtre.

Pomme de terre. — Culture grasse, épaisse, brunâtre, jaune foncé ou brune. Milieu non bruni.

Gélose Veillon. — Développement uniforme à toutes hauteurs. Colonies lenticulaires, régulières, blanches, ne dépassant guère 2 millimètres de diamètre. Pas de disque blanc à la surface du milieu. Quelques bulles.

Gélose au plomb. — Pas de noircissement de la masse. Dépôt noirâtre dans l'eau d'exsudation.

Gélatine. — Culture abondante, transparente, bleutée, à bords nets. Colonies isolées, brillantes et bien homogènes. Pas de liquéfaction.

Gélose glucosée au rouge neutre. — Fragmentée en vingt-quatre heures. Virage au jaune fluorescent en deux ou trois jours.

Lait tournesolé. — Rarement légèrement rosi dans les premières vingt-quatre heures (2 fois sur 10). Jamais rougi ni coagulé. Assez souvent (4 fois sur 12), anneau bleu en surface vers le troisième ou quatrième jour, beaucoup moins net que celui des cultures de para B.

Eau peptonée lactosée. — Toujours bleuie en quelques jours, rarement après une ébauche de virage au violet rosé ; presque toujours le bleuissement est primitif.

Petit-lait tournesolé. — Mêmes résultats.

Le tableau suivant fournit les résultats des réactions biochimiques en milieu de Barsiekow (sucre-nutrose-peptone). Le signe + seul indique virage sans précipitation de la nutrose ; le signe accompagné d'un chiffre indique que le milieu a viré, et que, de plus, il y a eu coagulation de la nutrose au bout d'un nombre de jours désigné par le chiffre. Nous ajoutons au tableau les résultats concernant la réduction des nitrates en nitrites, l'attaque de l'amidon et la réduction du sous-acétate de plomb.

Les échantillons n^os^ 13, 14, 17 proviennent de levures ; les autres, de bières.

NUMÉRO de la souche.	GLUCOSE	LÉVULOSE	GALACTOSE	MALTOSE	MANNITE	ARABINOSE	LACTOSE	SACCHAROSE	ACÉTATE DE PLOMB réduit.	HYDROLYSE de l'amidon.	RÉDUCTION des nitrates en nitrites.	ACIDITÉ d'arrêt.
1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 3	0	0	0	0	+	1,75
2	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 4	0	0	0	0	+	1,85
3	+ 1	+ 1	+ 1	+ 2	+ 2	+ 4	0	0	0	0	+	1,80
6	+ 1	+ 1	+ 1	+ 2	+ 2	+ 3	0	0	0	0	+	1,65
13	+ 1	+ 2	+ 2	+ 3	+ 3	+ 4	0	0	0	0	+	1,55
14	+ 2	+ 1	+ 2	+ 2	+ 2	+ 3	0	0	0	0	+	1,70
17	+ 1	+ 2	+ 2	+ 3	+ 3	+ 3	0	0	0	0	+	1,70
41	+ 3	+ 1	+ 1	+ 2	+ 8	+ 5	0	0	0	0	+	1,60
43	+ 2	+ 3	+ 2	+ 2	+ 4	+ 4	0	0	0	0	+	1,65
11	+ 2	+ 2	+ 2	+ 3	+ 3	+ 5	0	0	0	0	+	1,65
12	+ 2	+ 2	+ 2	+ 3	+ 4	+ 5	0	0	0	0	+	1,80

En somme, le glucose, le lévulose et le galactose sont attaqués les premiers, la coagulation du milieu de Barsiekow étant en général accomplie en quarante-huit heures, puis viennent le

maltose, la mannite et enfin l'arabinose. Toutes ces fermentations, y compris celle de l'arabinose, ont lieu avec dégagement de gaz. Le lactose et le saccharose ne sont absolument pas touchés.

Recherche de l'indol en eau peptonée toujours *négative*.

Inoculation. — Négative 3 fois sur 3 essais, malgré de fortes doses (2 centimètres cubes de bouillon de vingt-quatre heures dans le péritoine du cobaye).

Par ses caractères morphologiques, sa mobilité, ses réactions sur les sucres, ce bacille se rapproche manifestement des bacilles dits paratyphiques, ou plutôt des bacilles agents des salmonelloses; mais, malgré cette parenté évidente, il se différencie nettement :

1° Des paratyphiques A et B, en ce qu'il n'est pas agglutiné par les sérums agglutinant ceux-ci; même quand on emploie ces sérums au 1/30. Nous avons à maintes reprises tenté ces agglutinations avec des sérums fournis par l'Institut Pasteur, et avec d'autres provenant de malades ayant eu une hémoculture positive avec para A ou para B. Nos résultats ont toujours été négatifs.

2° De ces mêmes paratyphiques, du *B. enteritidis* de Gœrtner et des bacilles pathogènes agents des salmonelloses, par son innocuité absolue pour l'animal, même sous forme d'injections intrapéritonéales massives.

Il se différencie plus spécialement du bacille paratyphique A, par l'épaisseur de ses cultures, spécialement sur pomme de terre, où ce dernier microbe donne une culture à peine visible. De plus, il fait fermenter l'arabinose avec production de gaz, ce que ne fait pas le paratyphique A.

Il est plus voisin du bacille paratyphique B par ses caractères culturaux; mais, outre les raisons tirées des réactions d'agglutination et de l'inoculation, il s'oppose nettement à ce germe en ce qu'il n'éclaircit jamais le lait, même au bout de plusieurs semaines, et surtout ne noircit pas les milieux au sous-acétate de plomb. Ce caractère a pour nous une importance considérable, car nous n'avons jamais vu le noircissement faire défaut sur plus de 250 échantillons de para B obtenus par hémoculture.

En ce qui concerne le *B. enteritidis*, il ne pourrait être question de comparer à notre germe que ses variétés ne fermen-

tant ni le lactose, ni le saccharose ; mais celles-ci ne se différencient plus du para B que par des caractères d'agglutination, et sont d'ailleurs, comme lui, très pathogènes pour l'animal.

Il nous a donc semblé légitime de décrire comme espèce nouvelle ce germe que nous rencontrons avec une très grande fréquence dans les bières et levures de la région flamande, presque aussi souvent que le *B. lactis aerogenes* (variété mobile). Nous le faisons d'autant plus volontiers qu'il nous semble nécessaire de réunir ces germes dans une même famille et de les considérer l'un et l'autre comme appartenant à la flore bactérienne normale du malt. Le *B. hordeicola* n'est pas autre chose pour nous qu'un *B. aerogenes* mobile, n'attaquant ni le lactose, ni le saccharose ; et nous savons que déjà beaucoup d'*aerogenes* respectent ce dernier. D'autre part, nous avons isolé à trois reprises, mais chaque fois en grande abondance, une espèce identique au *B. hordeicola*, avec cette différence qu'elle ne fait plus fermenter la mannite. Nous la rangeons sans hésiter dans la même série, remarquant d'ailleurs qu'à mesure que diminue l'étendue des pouvoirs fermentatifs, les cultures sur géloses deviennent moins riches et se rapprochent par leur aspect des cultures de bacilles paratyphiques. Il n'en subsiste pas moins une différence certaine entre ces espèces, adaptées aux milieux végétaux, et inoffensives en général, et la série de germes apparentés au bacille du Hog choléra et au *B. enteritidis*, parasites des animaux et volontiers pathogènes.

B. ochraceus (*Zimmermann*, 1890).

Petit bâtonnet à bouts arrondis, ayant tout à fait l'aspect du coli, quoique généralement plus petit que ce dernier. Se colore bien par les couleurs d'aniline, les extrémités étant en général plus vivement colorées que le centre. Se décolore par la méthode de Gram-Nicole.

La plupart des échantillons ont été vus mobiles dès la première culture ; les autres, seulement après repiquage de souches déjà anciennes ou après passage en bile ou en gélose de Veillon. Tous ont été mobiles, et même très mobiles à un moment donné.

La vitalité de ce germe est considérable. Nous avons repiqué avec succès des souches de quatre mois.

Bouillon. — Trouble net en trois heures, très marqué en douze heures, intense en vingt-quatre. Dégagement actif de bulles gazeuses, si le bouillon n'est pas entièrement privé de sucre. Du troisième au quatrième jour, voile mince, assez fragile, dont les fragments s'accumulent au fond du tube où ils forment un dépôt grumeleux. Clarification très tardive et toujours incomplète.

Eau peptonée. — Mêmes caractères. Le voile prend, dans les vieilles cultures, une teinte nettement jaune.

Gélose inclinée. — Culture luxuriante, grasse, humide, jaune clair. Bande médiane saillante et lisse, bords inclinés en talus, brillants et transparents, finement striés, mais sans villosités. Gros prolongements radiés vers le bas de la culture. Parfois celle-ci a la viscosité d'une culture de *B. aerogenes*, et descend en véritable goutte vers le fond du tube. Abondant dépôt muqueux dans l'eau de condensation. Plus tardivement, pellicule légère à la surface de cette eau. Colonies isolées rondes, homogènes, demi-transparentes, à bords nets, réguliers.

Gélose en piqûre. — Disque saillant, jaune paille d'abord, puis jaune brun. Culture vigoureuse le long du trait.

Gélatine inclinée . — Culture plate, jaune mat, à bords transparents un peu dentelés. Aspect finement granuleux par transparence. Liquéfaction débutant entre le dixième et le quinzième jour. Complète en vingt jours. A l'étuve à 37 degrés, la gélatine est peptonisée en quarante-huit heures.

Pomme de terre. — Culture épaisse, grasse, jaune brun.

Gélose au plomb. — Pas de noircissement de la masse. Dépôt noir dans l'eau d'exsudation à la surface de la gélose.

Gélose glucosée au rouge neutre. — Fragmentée par les bulles de gaz en vingt-quatre heures. Virage au jaune fluorescent en trois jours.

Lait tournesolé. — Viré et coagulé parfois en vingt-quatre heures, toujours en moins de quatre jours.

Gélose lactosée tournesolée. — Culture extrêmement rapide dans son développement, grasse et luxuriante. Tournesol viré en deux ou trois jours. La pigmentation n'apparaît pas ou bien est masquée par la couleur du milieu.

Eau peptonée tournesolée. — Virée au rouge en vingt-quatre ou quarante-huit heures. Milieux sucrés de Barsiekow (nutrose-peptone-sucre) : Fermentation avec virage et coagulation pour glucose, lévulose, galactose, maltose, mannite, saccharose, arabinose.

L'inoculation de 2 centimètres cubes de culture en eau peptonée dans le péritoine d'un cobaye a tué l'animal en vingt heures. Péritonite et septicémie. Le bacille, examiné dans la sérosité louche du péritoine, y était immobile et semblait encapsulé. La culture du sang du cœur a donné une culture pure, où le bacille était très peu mobile.

Ce microbe élève fort peu l'acidité de son milieu.

Cultivé en bouillon glucosé d'acidité initiale égale à 0,10 *p.* 1.000 (*exprimée en* SO^4H^2 *et déterminée en présence de phtaléine*), *il ne l'a élevée qu'à* 0,22 *p.* 1.000 *après neuf jours de culture.*

Il a produit en assez grande abondance de l'anhydride carbonique. Dans le milieu, on a trouvé de l'alcool et de l'acétone ; on n'a pas trouvé d'acide lactique.

Il touche presque uniquement au sucre (*glucose avant culture*, 8 *gr.* 96; *après neuf jours de culture*, 4 *gr.* 60); *il ne touche presque pas à l'aliment azoté* (M. Javillier et R. Hazard).

Ce bacille est très fréquent dans les bières des Flandres. On le rencontre dans presque toutes les levures. Il nous semble, avec le *B. aerogenes*, dont il se rapproche à beaucoup d'égards, faire partie de la flore normale du malt, car nous n'avons jamais manqué de le rencontrer dans tous les échantillons de malt examinés. Cette circonstance nous avait invité à le rapprocher du *B. luteus* trouvé par Rotsewitch sur les épis de blé, et qui est également très court, très mobile et liquéfie la gélatine. Mais ce bacille reste coloré par la méthode de Gram et n'est pas pathogène. Parmi les autres bacilles à pigment jaune liquéfiant la gélatine, le *B. flavus* de Macé est le seul qui puisse être rapproché de notre microbe. Mais il est décrit comme immobile et non pathogène ; et de plus, sans dire explicitement qu'il forme des spores, Macé le laisse entendre, puisqu'il le différencie du *B. luteus sporogenes* de Smith et Baker, presque uniquement par la liquéfaction de la gélatine, que ce dernier ne produit pas ; alors que l'absence de production despores constituerait

une différence fondamentale. Le *B. synxanthus* d'Ehrenberg et le *B. lutescens* de Migula sont évidemment hors de cause, puisqu'ils alcalinisent le lait et digèrent sa caséine, alors que le nôtre l'acidifie et forme un caillot définitif. Les éléments du *B. ochraceus* de Zimmermann sont plus longs et forment parfois des chaînettes, ce que ne fait jamais notre germe ; la culture sur pomme de terre est plus mince ; la mobilité réduite à de lents déplacements onduleux. Ces différences ne sont pas fondamentales.

L'absence de toute indication sur les propriétés biochimiques de ce germe ne nous permet pas de pousser plus loin la comparaison. Mais, d'autre part, le caractère rudimentaire de la description de Zimmermann ne nous autorise pas à décrire notre germe comme une espèce nouvelle. Nous l'avons donc assimilé au *B. ochraceus*.

Ascobacterium lutescens (*espèce nouvelle*).

Très petit bacille en navette, ne prenant pas le Gram, extrait d'une macération de malt, où il était en symbiose avec un *B. aerogenes*.

Eléments libres très mobiles et de taille comparable à celle du coli. La caractéristique du genre *Ascobacterium* est la formation de zooglées. Celles-ci sont particulièrement nettes dans notre espèce. En bouillon, elles constituent de petites masses dans lesquelles les bacilles sont accolés côte à côte dans une disposition rappelant celle des grains d'un épi de millet. Les masses, un peu volumineuses, s'allongent, en effet, et forment de véritables épis cylindriques. En gélose, cette disposition se retrouve dans les travées denses qui constituent en quelque sorte le squelette de la colonie.

La résistance de ce germe à la chaleur est considérable. Nous avons pu repiquer avec succès une culture chauffée quarante-cinq minutes entre 70 et 75 degrés, et quinze minutes entre 70 et 50 degrés. Cette propriété peut d'ailleurs être utilisée comme le meilleur moyen de séparer l'*Ascobacterium* d'autres espèces avec lesquelles il forme des symbioses extrêmement tenaces.

Bouillon. — Développement extrêmement rapide, trouble en trois ou quatre heures. Voile blanc en six ou huit heures, solide,

remontant le long des parois du tube et se détachant plus tard en entier, sans se déchirer. Même dans les vieilles cultures, où les voiles tombés successivement constituent un dépôt épais, le liquide reste trouble.

Moût. — Mêmes caractères, culture très dense, voile épais, effiloché.

Eau peptonée lactosée. — Développement au moins aussi rapide. Virage au rose en six ou sept heures ; voile épais avec franges filamenteuses. Eclaircissement en quarante-huit heures, avec destruction presque totale du tournesol.

Gélose inclinée. — Colonie isolée caractéristique. Masse centrale dure, réfringente, constituée de travées épaisses formant une sorte de sphère creuse dont le centre est occupé par une masse hyaline, cloisonnée en partie par les prolongements de cette coque. Celle-ci envoie d'autres prolongements rayonnants et irréguliers dans la masse visqueuse et grasse qui entoure le noyau central.

La culture forme une bande brillante, granuleuse au centre, brillante et transparente sur ses bords. Il est impossible de détacher les zooglées avec l'anse de platine sans arracher la gélose. Couleur jaunâtre claire.

Gélose lactosée. — Culture exubérante, où les zooglées sont enfouies dans une masse visqueuse, grasse, coulant vers le bas du tube, où elle transforme l'eau de condensation en un liquide comparable au sirop d'orgeat. Virage au rouge très précoce.

Gélose Veillon. — Culture à toutes hauteurs. Colonies extrêmement caractéristiques, discoïdes, plates, presque sans épaisseur, en confetti blancs de 2 à 3 millimètres de diamètre.

Gélose en piqûre. — Culture également vigoureuse le long du trait et en surface. Les zooglées constituées le long du trait paraissent semi-transparentes ; en surface, elles forment des granules saillants sur un disque jaune.

Lait. — Coagulé régulièrement en quarante-huit heures avec formation d'une acidité dépassant 3 p. 1.000 en SO^4H^2.

Lait tournesolé. — Rouge en vingt-quatre heures, coagulé en quarante-huit heures

Gélatine en piqûre. — Petites colonies discoïdes le long du trait. Culture assez limitée en surface. Développement lent. Liquéfaction extrêmement lente.

Gélatine en plaques. — Petites colonies lenticulaires, beaucoup plus renflées qu'en gélose, blanches.

Pomme de terre. — Culture assez abondante grise et grenue, peu caractéristique.

Sérum coagulé. — Culture sèche, granuleuse, peu abondante. *Gélose au plomb* : ni fragmentation ni noircissement, *Gélose glucosée au rouge neutre* : ni fragmentation ni virage. *Eau peptonée amidonnée* : culture abondante, empois non dissous. Pas de réduction de la liqueur cupro-potassique; le milieu est nettement alcalin.

Milieux sucrés de Barsiekow. — Virage au rouge et coagulation de la nutrose en vingt-quatre heures pour glucose et lévulose; quarante-huit heures pour galactose, maltose et mannite; six jours pour l'arabinose; saccharose non attaqué.

Les sucres fermentent sans formation de gaz, mais il se fait une acidité faible 1,1 à 1,3 au plus en SO^4H^2 p. 1.000, quelquefois inférieure (0,80). Le dosage à la liqueur de Fehling montre que, si les sucres sont transformés, la proportion des corps réducteurs n'est diminuée que dans des proportions infimes.

Ce germe se rapproche évidemment beaucoup de l'*Ascobacterium luteum* de Babès. Il s'en distingue cependant : 1° par les caractères des cultures en gélatine, dont le développement est rapide pour l'*A. luteum*, lent pour l'*A. lutescens*; en piqûre, la colonie superficielle est jaune d'or pour l'*A. luteum*, jaune verdâtre extrêmement clair pour l'*A. lutescens*. Ce sont là de simples nuances.

Par contre, un caractère de l'*A. luteum* bien mis en évidence par la monographie de Cappuyns reproduite par Macé, le sépare nettement de l'*A. lutescens*. Le premier, en effet, ne forme pas d'acides avec les sucres et ne coagule pas le lait, qui devient seulement jaunâtre et filant.

L'*A. lutescens*, au contraire, fait fermenter tous les sucres, sauf le saccharose, avec production d'une acidité faible, mais constante, toujours supérieure à 80 p. 1.000 en SO^4H^2; il coagule toujours le lait, et le coagulum ne se dissout pas.

L'*Ascobacterium* aquatile de Moreno ne liquifie pas la gélatine et ne donne pas de voile en bouillon.

III

GROUPE ENTÉROCOQUE

Nous avons, au cours de cette étude, employé ce nom comme celui d'un groupe d'espèces plutôt que comme celui d'une espèce. La forme ovalaire des éléments qui se groupent souvent en diplocoques ou courtes chaînettes, et se colorent par le Gram; leur action sur la dextrine, le lactose, le glucose, aux dépens desquels ils forment de l'acide lactique, de l'acide acétique, formique et valérianique, sont certainement communs à des races de germes un peu différents. Mais il est, d'autre part, impossible de se baser, pour une différenciation spécifique, sur des caractères morphologiques. Rien n'est plus variable, en effet, que ces caractères dans les cultures d'entérocoques. On y peut rencontrer aussi bien de petits diplocoques à peine allongés, que de véritables bâtonnets. Certains de nos échantillons, que nous croyions d'abord très différents du *micrococcus ovalis* d'Escherisch, parce qu'ils se présentaient d'abord en longues chaînettes de diplocoques en grain de café, aplatis dans le sens transversal, se sont retrouvés dans des cultures plus âgées sous la forme ovoïde typique. D'autre part, si l'acidité d'arrêt de nos différentes souches en milieu sucré, oscillait toujours aux environs de 1,90 ou 2 p. 1.000, les différences individuelles ne permettaient pas de les répartir en espèces distinctes. Déjà d'ailleurs, en 1903, MM. Tissier et Gasching avaient pris le parti de réunir sous le nom d'entérocoque, non seulement le germe ainsi dénommé par Thiercelin, mais le *micrococcus ovalis* d'Escherisch, le *streptococcus acidi lactici* de Grotenfeld, et le streptocoque décrit dans certaines diarrhées par Hirsch et Libmann.

Il forme certainement la plus grande partie des microbes décrits dans les bières comme « ferments lactiques en cocci », et que nous avons pour notre part rencontrés avec une grande fréquence.

IV

SARCINES

Les sarcines sont extrêmement fréquentes dans les bières, où certaines d'entre elles passent pour pouvoir déterminer des altérations profondes : trouble, mauvais goût, etc.

Parmi celles que nous avons isolées, l'une est un ferment simple énergique : c'est la *Sarcina flava* (de Bary). Les autres, quoique très abondantes, ont des propriétés biochimiques moins caractérisées. La plupart, en milieu sucré, se comportent comme des ferments mixtes extrêmement faibles, c'est-à-dire qu'elles produisent aux dépens du sucre une quantité d'acide insignifiante, et cependant suffisante pour arrêter à la fois leur action sur les hydrates de carbone et sur les corps azotés.

Nous avons isolé en particulier les espèces suivantes :

1° Non chromogènes, ne liquéfiant pas la gélatine :
Sarcina pulchra (Henrici).
S. cerevisiæ (Lintner).

2° Non chromogènes, liquéfiant la gélatine :
S. alba (Zimmermann).

3° Chromogènes, ne liquéfiant pas :
S. aurantiaca (Gruber).
S. luteola (Gruber).
S. meliflava (Gruber).
S. carnea (Gruber).

4° Chromogènes, liquéfiant :
S. flava (de Bary).

Nous donnons plus loin la description de la *S. flava*, qui a vraiment un caractère bien spécial. La *Sarcina pulchra*, que nous décrirons d'abord, nous servira d'exemple pour le vaste groupe des sarcines agissant comme ferments mixtes faibles.

S. pulchra Henrici. — Eléments ronds, assez gros. Gram +; se groupant dans le bouillon en paquets à 3 dimensions de

8 à 12. Sur milieux solides, gros paquets typiques de 12 à 24 et plus.

Vitalité considérable. Cette sarcine a donné des cultures par ensemencement en gélose de Veillon, portée à 75 degrés, puis refroidie aussitôt après. En gélose de Veillon, comme en gélatine profonde, elle se comporte en aérobie strict, comme c'est la règle pour toutes les espèces que nous avons isolées.

Bouillon. — Trouble léger; fin dépôt le long des parois du tube. Au fond, dépôt excessivement visqueux et filant qu'on peut étirer en longs filaments, sans le dissocier, avec l'anse de platine. Ce dépôt filant est également de règle dans toutes nos cultures de sarcines.

Eau peptonée. — Cultures très pauvres. Mêmes caractères.

Gélose inclinée. — Bande blanche lisse, formée tout d'abord de petites colonies rondes, opaques; puis ces colonies se fusionnent en une couche blanche, épaisse.

Gélose en piqûre. — Disque blanc, saillant. Le long du trait, la culture ne descend pas au delà de 1 centimètre.

Gélatine inclinée. — Culture blanche porcelainée; pas de liquéfaction.

Gélose lactosée. — Culture vigoureuse, luxuriante, humide, assez opaque. Dépôt abondant au fond du tube. La gélose a viré au rouge, mais la culture est très blanche. Colonies discoïdes, 3 millimètres de diamètre, saillantes. Odeur de lait aigri bien marquée.

Lait tournesolé. — Non modifié en vingt-quatre heures; tend d'abord à s'éclaircir un peu au deuxième et troisième jour, puis devient rose au quatrième jour, mais ne se coagule pas. Cependant, au huitième jour, on peut obtenir la coagulation en le chauffant. Quelques échantillons de lait sont coagulés en quatre ou cinq jours.

Milieux sucrés de Barsiekow. — Acidification très légère avec glucose, maltose et saccharose; mais cette acidification, marquée par le virage du milieu, ne va jamais jusqu'à la coagulation de la nutrose, qui ne nécessite pourtant qu'une acidité de 0,30 p. 1.000 en acide sulfurique.

Sarcine jaune (Sarcina flava de Bary). — Sarcine fréquente

dans les bières flamandes. Elle a été rencontrée également dans un stout titrant 5 p. 100 d'alcool.

Cocci petits, prenant bien le Gram. Paquets typiques en bouillon et sur milieux solides.

Bouillon. — Milieu légèrement troublé, dépôt muqueux très filant.

Gélose inclinée. — Culture vigoureuse, bande plate, opaque, lisse, jaune vif, un peu verdâtre, à bords nets, constituée par la réunion de très fines colonies rondes.

Gélose en piqûre. — Disque plat, brillant, jaune franc. Le long du trait, la culture n'est vigoureuse que près de la surface.

Pomme de terre. — Culture assez mince, jaune vif.

Gélatine. — Culture rapide, début de liquéfaction dès la fin de la première journée, liquéfaction totale en quarante-huit heures, liquide uniformément jaune.

Sérum coagulé. — Liquéfaction rapide, pas de pigment.

Lait tournesolé. — Non modifié en vingt-quatre heures, en quarante-huit heures début de clarification en haut. Clarification totale en sept jours. Dépôt jaune au fond, crème verdâtre. La caséine a été peptonisée en douze jours.

Gélose lactosée. — Culture vigoureuse, opaque, humide, jaune vert, ne vire pas.

Eau peptonée lactosée et milieux sucrés de Barsiekow. — Aucun sucre n'est attaqué.

Pas d'indol.

V

BACILLES LACTIQUES

Bien que les bacilles lactiques ne se rencontrent pas, à beaucoup près, dans les bières flamandes, aussi abondamment que le laissent entendre les traités techniques de brasserie, nous avons pu cependant en isoler bon nombre d'échantillons, en utilisant, à la fois comme milieu de sélection et d'enrichissement, un petit-lait où avait vécu quelques jours, le *B. acidi paralactici* de Kosaï, et qui était acide à 3,80 p. 1.000 en SO^4H^2, acidité suffisante pour éliminer presque tous les concurrents des lactiques et des acidophiles. La séparation des germes était ensuite opérée en gélose de Veillon.

L'absence de bonnes descriptions rend très difficile l'identification d'espèces, même banales, et c'est malheureusement le cas pour les bacilles lactiques, dont deux ou trois espèces à peine, comme le *B. bulgare*, et le *B. acidi paralactici*, sont suffisamment caractérisées pour être reconnues à coup sûr. Les bacilles lactiques que nous avons rencontrés se rattachent presque tous à deux espèces répondant aux descriptions suivantes :

1. **B. lactis acidi** (*Leichmann*). — Petit bacille rectiligne, à extrémités un peu arrondies. Chaînettes de 4 à 6 éléments en moyenne en milieux liquides; formes courtes en bouillon ordinaire (2 à 3 μ), plus longues et plus minces en milieux sucrés et en lait (4 à 6 μ). Sur milieux solides, formes courtes, en cocci allongés, isolés ou soudés par deux, en sablier. Reste coloré par le Gram. Toujours immobile. Pas de spores.

Bouillon. — Trouble homogène léger, assez net en quarante-huit heures. Eclaircissement en quatre jours avec formation d'un léger dépôt.

Gélose inclinée. — Culture très mince, sèche, constituée de très petites colonies opaques. Ne pousse pas du tout sur certaines géloses.

Pomme de terre. — Culture minime ou nulle.

Gélatine inclinée. — Très petites colonies blanches, sans tendance à l'extension et ne se confondant que tard et toujours incomplètement.

Gélatine en piqûre. — Aucun développement en surface. Tout le long du trait, très petites colonies opaques, bien limitées, ne dépassant pas 2/10 de millimètre en diamètre. Aucune liquéfaction, même après séjour de plusieurs jours à l'étuve.

Lait tournesolé. — Non modifié en vingt-quatre heures, rougi en quarante-huit heures, coagulé en trois jours.

Géloses lactosée, maltosée, glucosée, lévulosée. — Pas de culture en vingt-quatre heures, points brillants en deux jours ; en trois jours petites colonies bien distinctes, ne dépassant jamais, même en six jours, le volume d'une très petite tête d'épingle. Le tournesol est rougi à partir du troisième jour.

Gélose glucosée Veillon. — Grosses colonies lenticulaires, régulières, non villeuses, se développant à toute hauteur et pouvant atteindre 2 à 3 millimètres de diamètre.

Milieux sucrés de Barsiekow rougis, avec précipitation de la nutrose en deux ou trois jours pour glucose, lévulose, galactose, lactose, maltose, mannite, saccharose et arabinose, ces deux derniers étant attaqués un peu plus lentement.

Bouillon glucosé : à 5 p. 100, trouble intense en vingt-quatre heures ; quelques flocons se forment ensuite et se déposent, mais le liquide reste toujours trouble.

Petit-lait. — Culture vigoureuse, trouble homogène, atteint en six jours une acidité de 6,2 p. 1.000 en SO^4H^2. *Cultivé en bouillon glucosé il a fourni une acidité totale de* 3,14 *p.* 1.000 (*exprimée en acide sulfurique*), *dont une très faible quantité,* 0,34, *d'acidité volatile.*

L'acidité fixe est presque entièrement constituée par de l'acide lactique.

D'une culture de dix jours, on a pu extraire plus de 6 *p.* 1.000 *de cet acide lactique* (M. Javillier).

Par la forme courte de ses éléments, parfois groupés en chaînettes qui rappellent celle de l'entérocoque, et par ses caractères de culture, ce bacille nous semble identique à celui décrit par Leichmann sous le nom de *Bacillus acidi lactici* (1). C'est

(1) Nous conservons à ce bacille le nom qui lui a été donné par Leich-

l'un des lactiques vrais les plus fréquents qu'on puisse rencontrer dans les malts et les bières.

2. B. lactyl-lacticus (*espèce nouvelle*). — Bacille toujours grêle. En lait, longues chaînettes de 15 à 20 éléments, longs chacun d'environ 5 μ, très grêles. En bouillon, filaments continus très longs, chaînettes d'éléments grêles comme en lait, ou chaînettes d'éléments un peu plus épais, à bouts carrés, jamais si trapus que dans la forme précédente. Les chaînettes et les filaments sont flexueux, les éléments terminaux des chaînettes et les extrémités des filaments sont souvent très incurvés. Dans les colonies prélevées en gélose profonde, ils présentent même de véritables boucles. Sur plaques de gélose, ce sont surtout de courtes formes, fortement incurvées, et des chaînettes de 3 ou 4 éléments. L'entrelacement des boucles séparées peut donner l'illusion de véritables nœuds. Ce bacille prend le Gram. Pas de spores.

Bouillon. — Pas de culture en 24 heures. Tout au plus, quelques ondes à peine perceptibles par agitation. En 48 heures, apparition de flocons légers qui se déposent lentement au fond, laissant le liquide absolument clair. Dès le 4e jour, la formation de ces flocons a cessé.

Gélose ordinaire. — Pas de culture, ni sur gélose inclinée, ni en piqûre.

Gélose ascite. — Pas de culture.

Gélatine inclinée. — Culture mince, très lente, très transparente, à bords finement dentelés. Surface granuleuse.

Gélatine en piqûre. — Colonies très fines, très transparentes, tout le long du trait, n'apparaissant qu'au bout d'une semaine environ. Aucune culture en surface.

Gélatine à l'étuve. — Culture assez abondante. Pas de liquéfaction.

mann (*Ueber die freiwillige Sauerung der Milch. Centralblatt für Bakt.*, 2e abth., t. II, 1896; p. 777). — Kosaï (*Zeitsh für Hygiene*, 1902) l'identifie à son *B. acidi paralactici*, dont il donne une excellente description. Ce dernier a d'ailleurs été constamment retrouvé, par MM. Tissier et Gasching, dans les laits aigris de la région de Paris. Bien qu'il soit certainement fréquent, même dans le malt, nous préférons conserver la dénomination due à Leichmann, non seulement en raison de sa priorité, mais aussi de quelques caractères par lesquels nos souches semblent se différencier du bacille de Kosaï : Trouble plus intense, présence de quelques grumeaux dans les milieux liquides. Ce sont d'ailleurs de simples nuances.

Pomme de terre. — Quelques points blancs à peine perceptibles au bout de plusieurs jours.

Sérum coagulé. — Pas de culture.

Lait tournesolé. — Non modifié en 24 heures, puis rougi d'abord en bas, puis sur toute la hauteur. Coagulation au 3e jour; parfois, plus tardivement.

Gélose glucosée Veillon. — Petites sphères très irrégulières, opaques, souvent échancrées, avec pointes saillantes. D'autres colonies sont presque lisses ou ne montrent que quelques piquants très courts. Pas de bulles.

Gélose sucrée en piqûre. — Culture abondante, opaque le long du trait. Les colonies profondes semblent les mieux développées. Autour de la piqûre, en surface, très petit disque de 4 millimètres de diamètre, mince et transparent. Pas de bulles.

Gélose au moût. — Culture assez lente, formée de très petites colonies rondes, opaques presque d'emblée.

Gélose lactosée tournesolée. — Points brillants à peine perceptibles à la loupe en 24 heures; en 48 heures, petites colonies séparées, toujours inférieures en diamètre à 1/2 millimètre, transparentes, non virées. Virage net à partir du 3e jour.

Eaux peptonées sucrées et tournesolées. — Très beaux flocons filamenteux dans le liquide clair, puis, en 48 heures, virage au rouge.

Bouillon glucosé à 16,5 p. 100. — Superbes flocons légers, filamenteux, transparents, suspendus en chaînes verticales dans le liquide clair. Aucune espèce de voile. Vers le 6e ou 7e jour, ces flocons ont achevé de se déposer et le liquide reste absolument clair.

Petit-lait acide (à 3,5 p. 1.000 en SO^4H^2). — Pas de culture en 24 heures, ondes nettes le 2e jour; trouble léger avec formation de petits flocons le 3e jour. L'acidité du milieu est portée en 7 jours à 7 p. 1,000 en SO^4H^2.

Cultivé en bouillon glucosé il a élevé l'acidité de son milieu à 2,65 °/oo (*acidité exprimée en* SO^4H^2, *titrée en présence de phtaléine*)

Il ne produit qu'une quantité infime d'acides volatils (acide acétique?) et presque uniquement de l'acide lactique. Du bouillon

glucosé on a pu extraire, après dix jours de culture, 4 p. 1.000 d'acide lactique.

Cultivé en petit-lait, il a élevé l'acidité de son milieu à 6,5 *p.* 1.000 (*exprimée en* SO^4H^2) *dont* 5,6 *d'acidité fixe correspondant en acide lactique à* 10 *p.* 1.000 (M. Javillier).

Innocuité absolue. 25 centimètres cubes d'une culture de 24 heures en bouillon glucosé ont été absorbés sans le moindre trouble.

Ce bacille, dont nous avons isolé plusieurs échantillons, ne se rapproche d'aucun des bacilles lactiques décrits jusqu'ici. Son aspect grêle, ses très longues chaînettes, et surtout ses formes incurvées à court rayon, en boucles, en nœuds, en anneaux brisés; la maigreur et la lenteur de ses cultures superficielles sur gélose, même sucrée; le caractère irrégulier de ses colonies en gélose profonde; les flocons légers, transparents, flottant dans un liquide absolument clair, qu'il forme en bouillons simples et sucrés; la lenteur de son action sur le lait, tout cela le rapproche beaucoup plutôt du *B. acidophilus* de Moro que d'aucun des bacilles lactiques dont nous ayons pu trouver la description. Mais il est plus franchement aérobie que l'*acidophilus*; fait en bouillon des flocons bien plus volumineux, pousse beaucoup mieux en gélatine ordinaire, où l'*acidophilus* ne se développe pas, et surtout il produit aux dépens des sucres presque exclusivement de l'acide lactique, alors que l'*acidophilus* donne surtout de l'acide acétique.

Nous ne discuterons même pas l'identité possible de ce bacille avec le *B. lacticus* de Pasteur et le *B. acidi lactici* de Hueppe, qui donnent des cultures épaisses, non seulement sur gélose, mais même sur pomme de terre, et troublent les bouillons; avec le *B. lactis acidi*, beaucoup plus trapu, jamais incurvé, donnant sur gélose des colonies opaques, et, en bouillon sucré, un trouble intense; encore moins avec d'autres bacilles qu'on décrit comme sporulés ou liquéfiant la gélatine. Quant au *B. bulgare* et au *B. acidi paralactici*, ces espèces sont trop bien caractérisées pour que l'hésitation soit permise; la puissance fermentative exceptionnelle du premier, et son incapacité à se développer en gélatine au-dessous de 20 degrés; la petite taille du second, les caractères très particuliers de ses cultures en bouillon sucré, où il ne donne qu'un trouble uniforme, avec un fin dépôt pulvéru-

lent sans flocons ni grumeaux au fond du vase, suffiraient à éviter la confusion. Nous avons d'ailleurs pu comparer ces deux bacilles à notre microbe.

L'espèce ainsi définie nous paraît assez répandue. Elle formait la flore dominante d'une bonne bière de la région, et nous l'avons retrouvée dans d'autres bières et dans des macérations de malt. Il est fréquent de trouver des échantillons peu vivaces, chez lesquels dominent les formes incurvées, et dont les propriétés fermentatives sont très atténuées. En raison de la forte proportion d'éther lactyl-lactique produite par notre bacille en milieux glucosés, caractère bien mis en évidence par les analyses de M. Javillier, nous lui avons donné le nom de *B. lactyl-lacticus*.

CONCLUSIONS

Le *B. coli* peut être rencontré vivant et en quantités considérables dans les bières les plus généralement fabriquées dans la région des Flandres ; bières obtenues par fermentation haute, peu alcoolisées, et peu acides.

Cette souillure n'est pas réalisée par l'introduction du bacille dans la bière achevée ; elle est due à une infection initiale du brassin, soit au cours du refroidissement du moût, soit par mélange de celui-ci avec une levure impure.

Le moût initialement souillé subit du fait de la fermentation une véritable épuration biologique, qui a pour résultat, lorsqu'elle est poussée assez loin, l'élimination, non seulement du coli, mais de nombreuses espèces microbiennes.

Les espèces appartenant à un même groupe sont en général éliminées presque en même temps. En particulier, tous les germes du groupe *coli-aerogenes*, où nous réunissons, avec le *B. coli* et le *B. lactis aerogenes*, une série d'espèces voisines, ont une évolution parallèle dans le brassin.

Le groupe *coli-aerogenes* se trouve, parmi les nombreux groupes d'espèces présents au début de la fermentation, des premiers à être éliminé.

Tandis que les bières non colifères ne semblent pouvoir causer de troubles gastro-intestinaux sérieux, que si le tube digestif est en quelque sorte prédisposé à ceux-ci par des infections antérieures, les bières colifères sont capables de provoquer les mêmes accidents en l'absence de toute prédisposition.

La présence constatée de coli-bacilles abondants rend donc une bière suspecte à double titre : elle indique que peuvent exister dans cette bière tous les autres germes du groupe coli, qui ont même résistance et même origine animale, et en parti-

culier les pathogènes intestinaux, bacilles typhiques, paratyphiques, dysentériques; elle indique de plus que l'épuration biologique du brassin n'est même pas commencée, et qu'aucune des espèces introduites au début de celui-ci n'a encore été éliminée.

La production de bières non colifères peut être réalisée, et l'est en fait par un grand nombre de brasseries, grâce à une série de mesures assurant la stérilité presque complète des appareils, la pureté approximative des levures, et la bonne qualité du moût indispensable à une vigoureuse fermentation.

* * *

Nous avons rencontré au cours de ces recherches, en dehors d'un très grand nombre d'espèces bien connues, d'autres, fréquentes et banales, mais très sommairement décrites dans les ouvrages classiques, et d'autres enfin, que nous considérons soit comme des variétés nouvelles d'espèces connues, soit comme des espèces entièrement nouvelles.

Vu par le président de la thèse :

PIERRE MARIE.

Vu :

Le Doyen : LANDOUZY.

Vu et permis d'imprimer :

Le vice-recteur de l'Académie de Paris :

L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS 5

INTRODUCTION : Objet, limites et plan 7

PREMIÈRE PARTIE

L'enquête régionale.

1° La brasserie flamande. Procédés régionaux de fabrication 15
Caractéristiques chimiques des produits 20
2° Propriétés hygiéniques de la bière flamande. L'opinion courante et les faits cliniques : Origine de l'enquête 23
3° Démonstration de la présence du coli : Technique des examens . . 27
Interprétation des résultats 30
Statistiques du premier trimestre de l'enquête 32

DEUXIÈME PARTIE

Les causes et les conditions de l'infection colibacillaire.

1° Hypothèses basées sur les particularités de la souillure colibacillaire, au point de vue quantitatif 35
Recherches sur la survivance et le développement du coli ensemencé dans une bière achevée. 37
2° Lieu, moment, mécanisme et marche de l'infection du brassin. . 39
3° Nature des souillures : eau, poussières, farine de malt. 49

TROISIÈME PARTIE

L'épuration biologique du brassin.

1° Constatation de l'élimination du *B. coli* et du *B. aerogenes* dans différent brassins 57
2° Généralisation : définition et démonstration des flores dominantes. 65
3° Evolution parallèle des espèces se rattachant à un même groupe. 72
4° Le groupe *coli aerogenes* est, dans un brassin, le premier à pulluler et des premiers à disparaître. 73
5° Facteurs de l'épuration. 80

QUATRIÈME PARTIE

La lutte contre l'infection des bières par le coli.

1° Signification de la présence du coli dans une bière. 87
a) Action comparée de bières colifères et non colifères sur le tube digestif de deux sujets. (Observation et expérimentations) . 87
b) Le coli comme témoin d'une épuration biologique incomplète du brassin. 90
2° Procédés de défense des brasseries contre l'infection. 92
3° Résultats des mesures employées par les brasseries flamandes. Statistiques. 96

Appendice bactériologique.

Le groupe *subtilis-mesentericus*. 98
Le groupe coli 99
Le *B. lactis aerogenes* typique et ses variétés nouvelles. 100
B. hordeicola (espèce nouvelle). 103
B. ochraceus (Zimmermann) 107
Ascobacterium lutescens (espèce nouvelle) 110
Le groupe entérocoque 113
Le groupe sarcines. 114
Sarcina pulchra Henrici 114
Sarcina flava de Bary 115
Le groupe des bacilles lactiques. 116
Bacillus lactis acidi Leichmann. 117
Bacillus lactyl-lacticus (espèce nouvelle) 118

Conclusions. 123

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.